

TESIS DOCTORAL

**TRANSPORTE Y ACCIÓN DE LAS HORMONAS  
TIROIDEAS EN CEREBRO DE RATÓN:  
INTERRELACIÓN ENTRE MCT8 Y LAT2**

BÁRBARA NÚÑEZ FERNÁNDEZ

Madrid, 2013



DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID**

**Transporte y acción de las hormonas tiroideas en  
cerebro de ratón:  
Interrelación entre Mct8 y Lat2**

Memoria presentada por la licenciada en Ciencias Biológicas  
Bárbara Núñez Fernández para optar al grado de Doctor  
por la Universidad Autónoma de Madrid

Director de Tesis: Juan Bernal Carrasco

Instituto de Investigaciones Biomedicas "Alberto Sols" de Madrid,  
CSIC-UAM

Madrid, 2013





Juan Bernal Carrasco, Profesor de investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" de Madrid (CSIC-UAM)

CERTIFICA: que Bárbara Núñez Fernández, licenciada en Ciencias Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación titulado:

"TRANSPORTE Y ACCION DE LAS HORMONAS TIROIDEAS EN CEREBRO DE RATON: INTERRELACION ENTRE MCT8 Y LAT2"

El que suscribe considera el trabajo realizado satisfactorio y apto para ser presentado como Tesis Doctoral en el Departamento de Bioquímica de la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste donde proceda, expide el presente certificado.

Madrid, 26 de Abril de 2013-04-26

Fdo. Juan Bernal Carrasco  
Director de la tesis



Esta tesis doctoral se ha realizado gracias al disfrute de una beca predoctoral con Referencia BES-2009-025014 asociada a los proyectos "SAF2008-01168" y "SAF2011-25608" concedidos al Dr. Juan Bernal Carrasco por el Ministerio de Ciencia e Innovación (actual Ministerio de Economía y Competitividad).





A mí madre, a mí padre  
y a Fede



## Agradecimientos





Se que a todos nos hace ilusión que pongan nuestro nombre en las páginas de agradecimientos, pero debo aclarar que pretendo ser lo más escueta posible y que no quiero hacer un listado de nombres con todas las personas que he conocido durante estos años y que me han ayudado en todo este trabajo. Está claro que, el hecho de que algunos nombres no estén escritos explícitamente en estas páginas no quiere decir que no les esté infinitamente agradecida y confío en que cada persona que me ha ayudado, mucho o poco, lo sabe y espero que no se sienta molesta por ello.

Por supuesto, le tengo que agradecer a Juan que me haya dado la oportunidad de hacer la tesis en su grupo. Es una gran persona y una enciclopedia andante de la que se aprende cada vez que hablas con él.

De la misma manera, mil gracias a todos los miembros del grupo 2.10 que he conocido desde que llegué y que me han ayudado y enseñado tanto. De todos ellos, Pilar se merece una dedicatoria para ella sola por ser algo más que una compañera de trabajo. Su alegría y su entusiasmo es una fuente de energía cada día. Me alegro mucho de haberme encontrado contigo, eres una magnífica persona. Espero que no perdamos el contacto cuando no te tenga a mí espalda todos los días. ¡Te quedas sin taxista! Y lo mismo con la loca de Maricar, que animaba los largos días de laboratorio con sus cánticos. Las dos vais a ser seguro los mejores recuerdos que me queden del laboratorio de todos estos años.

Ni que contar de las horas de relax en las comidas con, entre otros, Sol (muchísimo ánimo que todavía estás empezando pero al final se pasa rapidísimo!) y Daniela (me has ayudado un montón!) Ana y Sandra; León, Lara y of course, Petri. Petri eres un encanto de persona. Mucho ánimo, lo conseguirás. Sois todos majísimos!

En definitiva, muchas gracias a toda la gente del IIB que de alguna manera forma parte de este trabajo y que han hecho más agradable el día a día, desde los servicios de genómica, histología, animalario, radiactividad, imagen... hasta la ayuda de MJ. Obregón con los odiosos RIA, de Ana Guadaño con las *In situs* o de Ana Sastre con sus tiroides y su gran ayuda en los últimos momentos de estrés con el Word, Endnote, etc.

Por otro lado, gracias por los ánimos de Chusa, de María, de Santi el verdadero (aunque también del falso), de Nachito, de Guille... ¡que lejos estamos últimamente! I miss you..

En cuanto a su ayuda con mi salud sobretodo durante estos últimos meses, tengo que agradecer a Sergio, por sus manos y sus descuentos, a Blanca, de la que he aprendido mucho más que Pilates y a Silvia.

Y por supuesto, millones de gracias a toda mi familia. Porque sé que siempre van a estar ahí para ayudarme y que, aunque ninguno pueda entender lo que hago, todos saben que ha sido un esfuerzo muy grande para mí. A todos mis tíos/tías y primos por ambas partes les dedico un cachito de este trabajo. María, seguro que consigues buena nota en la selectividad para entrar en biología. Espero que te guste tanto como me gustó a mí. Marta, puedes conseguir lo que te propongas, eres mucho más inteligente de lo que piensas, no te rindas. Os va gustar ir a la universidad. A mis hermanas, Híurika y Melany, que siempre han sido muy importantes para mí. Y a mis nuevos sobrinos, Mídorí y Jonás que son guapísimos y los quiero un montón. A mis cuñados, Felipe y Miguel. A mis abuelos por sentirse tan orgullosos de mí. Y a la familia de Fede por tratarme tan bien.

Está claro que Fede es una de las personas más importantes en mi vida desde hace ya unos cuantos años y por eso le quiero dedicar un cachito más grande de este trabajo. Muchas gracias por estar siempre a mi lado, por tu apoyo, por tu paciencia, por tu fuerza de voluntad a la hora de conseguir lo que quieres, por todo lo que me enseñas cada día, por tus abrazos, por hacerme reír, por ser una bellísima persona y sobre todo, por quererme tanto.

Pero por encima de todos, haber conseguido llegar hasta aquí no hubiera sido posible sin el esfuerzo incansable de mi madre. Muchas gracias por todo lo que me has dado siempre, por ayudarme tantísimo, por estar conmigo siempre que te he necesitado y por hacer de mí una buena persona. Eres la mejor madre del mundo. Y por todo eso te dedico esta tesis con todo mi cariño. Creo que puedes estar contenta porque has cumplido tu objetivo en la vida. Además, le dedico esta tesis a Mi Padre.

Resumen





Las hormonas tiroideas (HT) juegan un papel indispensable durante el desarrollo regulando múltiples procesos biológicos. La importancia de transportadores específicos que facilitan la entrada de las HT al interior celular ha quedado demostrada con el descubrimiento de mutaciones en el transportador MCT8. La deficiencia de MCT8 en humanos causa un síndrome endocrino con afectación neurológica ligado al cromosoma X denominado síndrome de Allan-Herndon-Dudley. Las graves alteraciones neurológicas podrían deberse a un aporte insuficiente de T3 a las neuronas durante periodos críticos del desarrollo.

Para el estudio de la fisiopatología del síndrome se han creado ratones deficientes de Mct8. Estos ratones muestran el perfil de HT circulantes típico de la enfermedad pero curiosamente, no presentan alteraciones neurológicas. Los ratones poseen mecanismos compensadores que evitan la aparición de un fenotipo de hipotiroidismo cerebral. Se cree que la presencia de transportadores alternativos a Mct8 en ratones que suplan su función y que no estén presentes en humanos podrían ser los responsables de la diferencia de fenotipo. El transportador de aminoácidos Lat2 con capacidad de transportar T3 y T4 se ha propuesto como posible transportador alternativo a Mct8. En humanos la presencia de este transportador durante el desarrollo fetal queda restringida a la microglia, mientras que en ratones se expresa fuertemente en neuronas en desarrollo. Esta diferencia podría permitir la entrada de T3 en las neuronas de ratón durante periodos críticos del desarrollo en ausencia de Mct8, mientras que los humanos serían más dependientes del aporte de T3 a través de MCT8.

En busca de un modelo de ratón que reprodujera la enfermedad también en sus trastornos neurológicos hemos generado ratones dobles knock-out de *Mct8/Lat2*. Los ratones adultos dobles knock-out de *Mct8/Lat2* no muestran hipotiroidismo cerebral ni alteraciones neurológicas debidas a un aporte de HT insuficiente. Sin embargo, el transportador Lat2 tiene especial importancia en el aporte de HT al cerebro durante la edad perinatal, comportándose como transportador alternativo a Mct8 durante los primeros días de vida. Sorprendentemente, la deficiencia de Mct8 en animales de edad perinatal causa un estado de hipertiroidismo cerebral.







Thyroid hormones (TH) play an essential role during development controlling multiple biological processes. The importance of the specific transporters which facilitate the uptake of TH into the cells was demonstrated with the finding of mutations in the MCT8 transporter. In humans, deficiency of MCT8 causes an X-linked endocrine syndrome with neurological impairment denominated Allan-Herndon-Dudley syndrome. The serious neurological symptoms might be due to an insufficient T3 supply into neurons during critical periods of the development.

To study the pathophysiology of the syndrome Mct8-deficient mice were generated. These mice show the typical circulating TH profile of the illness but curiously, they do not present neurological alterations. Mice have compensatory mechanisms to avoid a cerebral hypothyroidism phenotype. It is thought that the presence of alternative transporters to Mct8 in mice which can supply its function and not present in humans might be responsible for the different phenotype. The amino acid transporter Lat2 with capacity to transport T3 and T4 has been proposed as a possible alternative transporter to Mct8. In humans the presence of this transporter during fetal development is restricted to microglia, while in mice it is highly expressed in developing neurons. This difference could allow T3 uptake into the mouse neurons during critical developmental periods when Mct8 is absent, while the humans would rely heavily on T3 supply through MCT8.

In search of a mouse model to reproduce also the neurological disorders of the illness we have generated a double *Mct8/Lat2* knock-out mice. Adult *Mct8/Lat2* knock-out mice neither show cerebral hypothyroidism nor neurological impairment due to an insufficient TH supply. However, Lat2 transporter has special relevance in the transport of TH into the brain during perinatal stage. Lat2 behaves like alternative transporter to Mct8 throughout the first days of life. Surprisingly, deficiency of Mct8 causes a relative cerebral hyperthyroidism stage in perinatal animals.



Índice





ABREVIATURAS.....	i
INTRODUCCIÓN.....	1
1. Las hormonas tiroideas.....	1
1.1 Síntesis y secreción .....	1
1.2 Metabolismo y control de las concentraciones de hormonas tiroideas.....	3
1.3 Mecanismos de acción de las hormonas tiroideas .....	4
1.4 Control de la disponibilidad de T3 en el cerebro .....	5
1.5 Importancia de las hormonas tiroideas en el desarrollo del SNC.....	7
2. Transporte de las hormonas tiroideas .....	10
2.1 Transportadores de hormonas tiroideas.....	10
2.1.1 Familia NTCP.....	10
2.1.2 Familia OATP ( <i>organic anion-transporting polypeptides</i> ) .....	10
2.1.3 Familia MCT (monocarboxilatos) .....	11
2.1.4 Familia HAT.....	12
3. Síndrome de Allan-Herndon-Dudley .....	14
4. Fenotipo de los ratones Knock-out de <i>Mct8</i> .....	16
5. Fenotipo de ratones Knock-out de <i>Lat2</i> .....	20
OBJETIVOS.....	21
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
1. Animales de experimentación.....	22
1.1 Obtención de los ratones knock-out de <i>Mct8</i> y su genotipado .....	22
1.2 Obtención de los ratones knock-out de <i>Lat2</i> y su genotipado .....	22
1.3 Obtención de los ratones dobles knock-out de <i>Mct8Lat2</i> .....	23
1.4 Tratamiento: Inducción de hipotiroidismo .....	25
1.5 Sacrificio y obtención de muestras.....	25
1.5.1 Extracción de tejidos para obtención de ARN y para la determinación de las concentraciones de hormonas tiroideas.....	25
1.5.2 Extracción de tejidos para técnicas histológicas.....	25
1.5.3 Extracción de sangre para la obtención de plasma.....	26
2. PCR en tiempo real.....	26
3. Hibridación <i>in situ</i> radiactiva .....	27
4. Inmunohistoquímica.....	28

5. Hibridación <i>in situ</i> radiactiva combinada con inmunohistoquímica y revelado con emulsión autorradiográfica.....	28
6. Tinción de Nissl.....	29
7. Determinación de T3 y T4 en tejidos y plasma mediante radioinmunoensayo (RIA) ..	29
7.1 Síntesis de T3 y T4 marcadas radiactivamente y extracción de HT de los tejidos ..	29
7.2 Determinación de T3 y T4 en extractos de plasma y tejidos .....	30
8. Determinación de la actividad D2 en corteza cerebral.....	31
9. Determinación de TSH.....	32
10. Estudio de comportamiento: Rotarod.....	32
11. Análisis estadístico de los resultados.....	32

## RESULTADOS.....33

1. Obtención de ratones dobles KO de <i>Mct8Lat2</i> y sus características fenotípicas a la edad de P21 y Adultos.....	33
1.1 Alteraciones endocrinas.....	33
1.2 Alteraciones neurológicas .....	35
2. Los animales KO de <i>Mct8</i> presentan un estado de "hipertiroidismo cerebral" en edades posnatales tempranas .....	40
3. Estudio de la expresión génica a lo largo del desarrollo en animales KO de <i>Mct8Lat2</i> .....	42
4. Determinación de las concentraciones de hormonas tiroideas y actividad Desyodasa tipo 2 en cerebro en edades tempranas del desarrollo. ....	47
5. Expresión de transportadores .....	51
5. 1 Expresión de Mct8 y Lat2 en cerebro mediante qPCR.....	51
5.2 Expresión de Mct8 y Lat2 en cerebro mediante hibridacion in situ .....	54
5.3 Expresión de Lat2 en cerebro mediante inmunohistoquímica .....	57

## DISCUSIÓN.....59

1. Deficiencia de Mct8 en ratones de edad P21 y adultos.....	60
2. Deficiencia de Lat2 en ratones de edad P21 y adultos.....	61

3. En ratones de edad P21 y adultos la delección adicional de <i>Lat2</i> no agrava el síndrome provocado por la deficiencia de Mct8 .....	63
4. La deficiencia de Mct8 provoca un estado " <i>hipertiroideo cerebral</i> " en edades posnatales tempranas .....	63
4.1 La ausencia de Mct8 provoca hipertiroidismo en edades perinatales .....	64
4.2 La delección de Mct8 incrementa la acción de las hormonas tiroideas en cerebro en edad perinatal.....	65
5. El transportador Lat2 juega un papel relevante en el transporte de HT al cerebro durante la edad perinatal.....	66
6. La deficiencia de Lat2 revierte el "hipertiroidismo" causado por la ausencia de Mct8 en animales dobles KO de edad perinatal .....	68
7. Flujo de hormonas tiroideas desde la barrera hematoencefálica a las células neurales. ....	69
8. Oatp14, otro posible transportador alternativo para compensar la deficiencia de Mct8 en ratones .....	72
CONCLUSIONES.....	74
BIBLIOGRAFÍA.....	75
APÉNDICE: PUBLICACIONES RELACIONADAS.....	83



Abreviaturas



AHD.....	Allan-Herndon-Dudley
ANOVA.....	Análisis de la varianza
BHE.....	Barrera hematoencefálica
BSA.....	Bovine serum albumin (seroalbúmina bovina)
Cb.....	Cerebelo
Cgi.....	Capa granular interna
Cge.....	Capa germinal externa
Cpm.....	Cuentas por minuto
Ctza.....	Corteza cerebral
D1, D2, D3....	Desyodasas tipo 1, 2 y 3
DIT.....	Di-yodo tirosina
DTT.....	Dithiothreitol (ditiotreitól)
E17.....	Edad embrionaria de 17 días
EDTA.....	Ethylenediaminetetraacetic acid (ácido etilendiamino-tetracético)
Estr. ....	Núcleo estriado
HT.....	Hormonas tiroideas
Km.....	Constante de Michaelis
KO.....	Knock-out
LAT.....	L-type heterodimeric amino acid transporters (transportadores heterodiméricos de aminoácidos de tipo-L)
LCR.....	Líquido cefalorraquídeo
MCT.....	Monocarboxylate transporters (transportadores de monocarboxilatos)
MIT.....	Mono-yodo tirosina
MLG.....	Modelo lineal general
MMI.....	2-mercapto-1- methylimidazole (2-mercapto-1-metil imidazol)
NIS.....	Simportador de yoduro y sodio
OATP.....	Organic Anion Transporter Polypeptide (transportadores de aniones orgánicos)
P0.....	Día de nacimiento
P15, P21.....	Día postnatal 15, día postnatal 20
qPCR.....	Quantitative Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa)
PF.....	Paraformaldehído
PTU.....	6-Propyl-2-thiouracil (6-propil-2-tiouracil)
RIA.....	Radioinmunoanálisis
rT3.....	3, 3', 5'-triyodotironina o T3 reversa
RXR.....	Retinoid X receptor (receptor del ácido 9-cis-retinoico)
SN.....	Sistema nervioso
SNC.....	Sistema nervioso central
T1.....	Monoyodotironina
T2.....	3, 3'-diyodotironina
T3.....	3, 5, 3' triyodo-L-tironina o Triyodotironina
T4.....	3, 5, 3', 5' tetrayodo-L-tironina o tiroxina
Tg.....	Tiroglobulina
TPO.....	Tiroperoxidasa
TR.....	Thyroid hormone receptor (receptor de hormonas tiroideas)
TRE.....	Thyroid hormone response element (elemento de respuesta a hormona tiroidea)
TRH.....	Thyrotrophin releasing hormone (hormona liberadora de tirotropina)
TSH.....	Thyroid-stimulating hormone (hormona estimuladora del tiroides)
Wt.....	Wild type, ratones silvestres





# Introducción

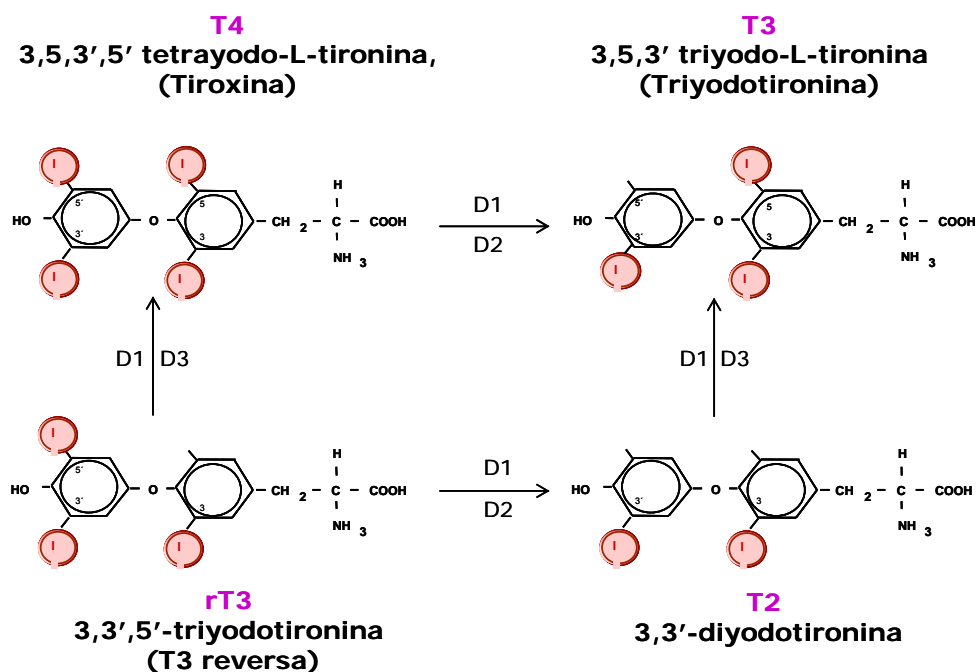


## 1. Las hormonas tiroideas

Las hormonas tiroideas (HT) son esenciales para el correcto desarrollo y crecimiento de todos los vertebrados. Tienen efectos sobre casi todos los tejidos del organismo: actúan en el desarrollo y función del sistema nervioso central y periférico, regulan el metabolismo basal, tienen acción termorreguladora, influyen en la síntesis y degradación de carbohidratos, grasas y proteínas, aumentan el consumo de oxígeno, etc. Puesto que las funciones de estas hormonas son de vital importancia, fallos en la producción y transporte de las mismas conducen a graves trastornos. Un desequilibrio en el balance de las HT en adultos suele ser reversible con un adecuado tratamiento. Por el contrario, la deficiencia de HT durante el desarrollo causa daños irreversibles más o menos graves dependiendo del momento del desarrollo y el tiempo en el que se produzca la falta de hormona.

### 1.1 Síntesis y secreción

Las HT y sus productos de degradación tienen una estructura química derivada de la tirosina y contienen entre 2 y 4 átomos de yodo que determinan en gran medida la actividad biológica (Fig.1). Al ser un componente integral de las HT, el yodo se convierte en un elemento esencial en la dieta.



**Figura 1. Estructura y metabolismo por desyodación de las hormonas tiroideas.** Las HT están formadas por 2 anillos bencénicos unidos por un puente de oxígeno. Poseen entre 2 y 4 átomos de yodo. Las desyodasas D1, D2 Y D3 catalizan la eliminación de átomos de yodo en las posiciones 5 o 5' produciendo la activación o inactivación de las HT.

La síntesis de las HT requiere un desarrollo normal de la glándula tiroides, un adecuado aporte de I y una serie de procesos bioquímicos altamente regulados en las células foliculares (Taurog, 2000).

Los folículos constituyen la unidad básica funcional del tiroides. Son estructuras ovoides formadas por una única capa de células foliculares polarizadas (tirocitos) dispuestas alrededor de una sustancia llamada coloide que ocupa el lumen del folículo. El transportador de yoduro denominado NIS (*sodium-iodide symporter*) (Dai, 1996), situado en la membrana basal, confiere a la célula tiroidea la capacidad de acumular I<sup>-</sup> en contra de gradiente. La unión covalente del I<sup>-</sup>, oxidado por la acción de la peroxidasa tiroidea (TPO), a los radicales tirosílicos de la Tiroglobulina (Tg), da lugar a MIT y DIT que, tras un proceso de acoplamiento, originan la T3 y T4 en su seno (Lamas, 1977; Gavaret, 1981). La molécula de Tg madura se almacena en el lumen folicular (coloide). Tras la estimulación por TSH pasa por endocitosis al interior de las células sufriendo un proceso de degradación y liberándose las HT. La T3 y T4 libres se descargan al torrente circulatorio en un proceso en el que interviene el transportador Mct8.

La T4 es la forma predominante de hormona secretada por el tiroides (aproximadamente un 80%). Aunque la T3 es secretada en menor cantidad es la forma biológicamente activa a nivel genómico. La mayor parte de T3 en el organismo se forma por desyodación de la T4 en los tejidos mediante la acción de desyodasas.

La secreción tiroidea está regulada por un sistema de retroalimentación negativo en el que interviene el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides. La hormona liberadora de tirotrópina (TRH) es neurosecretada por el núcleo paraventricular del hipotálamo y, a través de los vasos porta hipofisarios, llega a la hipófisis anterior (adenohipófisis), donde la unión a su receptor en la membrana de las células tirotropas desencadena una cascada de traducción de señales que promueve la síntesis de TSH (hormona estimuladora del tiroides o tirotrópina) y su secreción. La TSH se libera a la circulación general y actúa sobre la glándula tiroidea estimulando los procesos involucrados en la síntesis y secreción de las HT (Chiamolera, 2009).

## 1.2 Metabolismo y control de las concentraciones de hormonas tiroideas

La actividad biológica de las HT está condicionada por numerosos factores: las concentraciones de hormonas circulantes, las actividades de las diferentes desyodasas y la presencia de transportadores específicos responsables de facilitar el paso de las hormonas al interior celular son algunos de los factores que controlan la disponibilidad intracelular de T3.

La desyodación progresiva constituye una de las vías más importantes del metabolismo de las HT. La acción de las desyodasas supone la activación o degradación mediante la eliminación de átomos de yodo de las distintas yodotironinas.

Existen tres tipos de desyodasas implicadas en el metabolismo de las HT que se diferencian entre sí por sus preferencias de sustrato, su distribución tisular y sus inhibidores específicos (Fig. 1) (Köhrle, 2002; Gereben, 2008a; Gereben, 2008b; Williams, 2008):

- 1- Desyodasa tipo 1 (D1, gen *Dio1*): localizada principalmente en órganos que permiten un rápido intercambio de HT con el plasma como son el hígado, la piel, el tiroides y los riñones. Cataliza la eliminación del átomo de yodo en la posición 5' del anillo externo y en la posición 5 del anillo interno generando T3, rT3 o T2 dependiendo del sustrato. Presenta una constante de Michaelis (Km) de 2,3  $\mu$ M (T4) y 0,06  $\mu$ M (rT3). En roedores la mayor parte de la T3 circulante proviene de la desyodación de T4 gracias a la acción de esta desyodasa en hígado y riñón.
- 2- Desyodasa tipo 2 (D2, gen *Dio2*): se expresa en tejidos de intercambio lento donde las concentraciones intracelulares de T3 son críticas. Controla la producción local de T3 protegiendo estructuras vitales de posibles déficits de hormona. Se expresa en encéfalo (fundamentalmente en astrocitos y tanicitos), hipófisis anterior y tejido adiposo marrón. En humanos además se expresa en corazón, tiroides y músculo esquelético. Cataliza la eliminación del átomo de yodo en la posición 5' del anillo externo generando T3 a partir de T4 (Km=1nM) o T2 a partir de la rT3.
- 3- Desyodasa tipo 3 (D3, gen *Dio3*): se expresa en cerebro, piel y abundantemente en tejidos fetales, útero y placenta sugiriendo un importante papel protector del feto de un exceso de T3 durante el desarrollo. Esta desyodasa cataliza la conversión de

T4 y T3 a metabolitos inactivos eliminando los átomos de yodo en la posición 5 del anillo interno con una Km de 6nM (T3) y 37nM (T4) generando rT3 o T2 respectivamente.

### 1.3 Mecanismos de acción de las hormonas tiroideas

Las HT actúan fundamentalmente a nivel del núcleo celular regulando la tasa de transcripción génica. De esta forma, controlan la expresión regional y temporal de un gran número de genes implicados en numerosos procesos fisiológicos. La hormona activa a nivel transcripcional es la T3. Las acciones genómicas se inician con la unión de la T3 a su receptor nuclear (TR).

Los TRs son factores de transcripción regulados por ligando pertenecientes a la superfamilia de receptores nucleares (Aranda, 2001; Yen, 2001; Flamant, 2006; Oetting, 2007). En mamíferos, los TRs están codificados por dos genes, THRA y THRB. El gen THRA codifica las isoformas TR $\alpha$ 1, TR $\alpha$ 2, TR $\alpha$ 3, TR $\Delta\alpha$ 1 y TR $\Delta\alpha$ 2 de las cuales sólo TR $\alpha$ 1 une T3. El gen THRB produce 2 isoformas con unión a T3, TR $\beta$ 1 y TR $\beta$ 2.

Los TRs presentan una estructura modular con diferentes dominios funcionales. El denominado “dominio de unión al ADN” (*DNA binding domain, DBD*), altamente conservado, interacciona con secuencias específicas de ADN de los genes diana de HT conocidas como “elementos de respuesta a T3” (*Thyroid Response Element, TRE*) (Umesono K, 1991; Williams GR, 1994). Aunque los receptores pueden unirse al TRE como homodímeros, la heterodimerización con el receptor de ácido retinoico (RXR) incrementa la eficiencia de unión al ADN y la actividad transcripcional. El denominado “dominio de unión a ligando” (*Ligand Binding Domain, LBD*) presenta una región AF-2 que constituye un dominio de activación transcripcional dependiente de ligando. El LBD une T3 de manera reversible con alta afinidad, y adicionalmente, media la dimerización del receptor e interacciona con proteínas nucleares co-reguladoras que poseen actividades enzimáticas capaces de reprimir (co-represoras) o de activar (co-activadoras) la transcripción génica (Chen, 1995; Petty, 1995; Wagner, 1995).

El modelo general de acción de la T3 se basa en la estimulación de la transcripción génica mediante su unión a los TRs. Sin embargo, de manera dependiente de ligando, los TRs también pueden reprimir la transcripción génica. En el caso de la regulación positiva,

en ausencia de T3 existe una interacción entre el heterodímero (RXR-TR), unido al *TRE*, con proteínas co-represoras y complejos con actividad desacetilasa de histonas (Sap, 1989; Grunstein, 1997). La cromatina se mantiene compactada inhibiendo la transcripción del gen diana. La unión de la T3 al TR provoca un cambio conformacional en éste que permite el desplazamiento de los co-represores y la unión de proteínas co-activadoras. La actividad acetilasa de histonas de las proteínas co-activadoras promueve la descompactación de la cromatina permitiendo el inicio de la transcripción génica (Li, 1999; Glass, 2000).

Por el contrario, se habla de regulación negativa cuando la ausencia de ligando permite la transcripción basal del gen y la unión de T3 al TR reprime la expresión génica. En algunos casos el mecanismo funciona de forma inversa a la regulación positiva, es decir, los co-represores actúan como co-activadores y viceversa (Wang, 2009). Sin embargo, no se conocen en detalle los mecanismos moleculares implicados en este tipo de regulación.

Recientemente se han descrito acciones no genómicas de las HT con puntos de inicio en la membrana plasmática y el citoplasma, así como acciones sobre las mitocondrias. Una revisión muy interesante de este tema sería la que recoge Sheue-Yann Cheng en su artículo *Molecular aspects of thyroid hormone actions* (Cheng, 2010).

#### 1.4 Control de la disponibilidad de T3 en el cerebro

Para que las HT alcancen las células diana en el cerebro es necesario que atraviesen las fuertes barreras que restringen el paso de sustancias desde la circulación. Las barreras constituyen un mecanismo protector frente a sustancias dañinas para el SNC.

La principal barrera es la barrera hematoencefálica (BHE). Está formada por células endoteliales fuertemente unidas por “uniones estrechas” de los capilares que irrigan el SNC. La BHE permite de manera selectiva el paso de sustancias nutritivas y vitales como la glucosa, algunos iones y oxígeno, bloqueando al mismo tiempo la entrada de sustancias tóxicas para el tejido cerebral.

La otra barrera es la que existe entre los plexos coroideos y el líquido céfaloorraquídeo. Los plexos coroideos están formados por un estroma central con capilares fenestrados

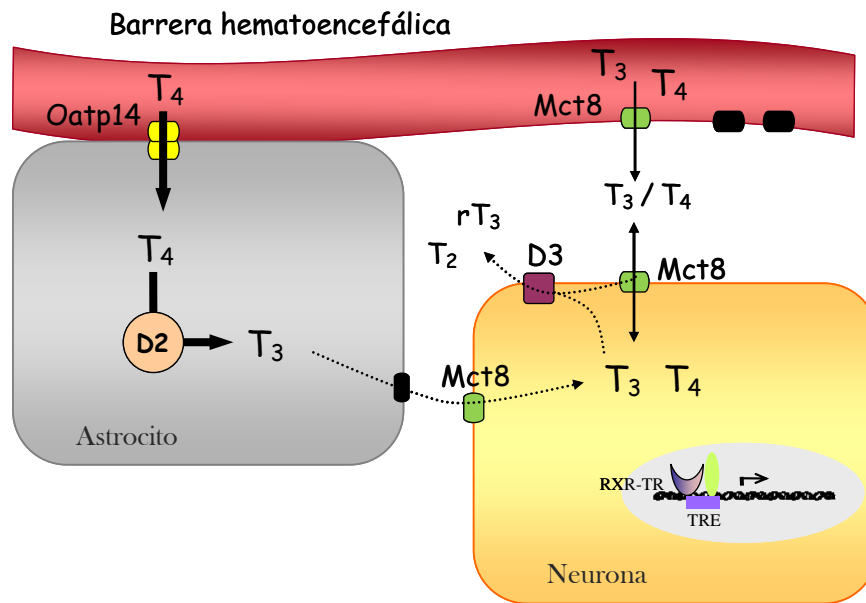
tapizado por células epiteliales también unidas fuertemente por “uniones estrechas”, encargadas de producir el líquido cefalorraquídeo que circula por los ventrículos cerebrales.

En el cerebro, la T3 ejerce su acción principalmente en las neuronas regulando la expresión génica (Bernal, 2007). Las vías por las que la hormona activa T3 es capaz de llegar a las neuronas serían las siguientes (Fig.2):

- Mediante el paso directo de la T3 circulante al fluido intersticial cruzando la BHE y su posterior entrada en las neuronas.
- Los pies de los astrocitos rodean los capilares cerebrales. Esta característica permite que las HT, especialmente la T4, sean transportadas a través de la BHE y alcancen directamente los astrocitos sin pasar por el fluido intersticial. La actividad de la D2 en este tipo de células gliales ejerce un control local de la disponibilidad de T3 mediante la conversión de la T4 a T3. Posteriormente la T3 es transportada hasta las neuronas donde ejercerá su función en el núcleo (Guadaño-Ferraz, 1997). Esta ruta tiene especial importancia durante las primeras etapas del desarrollo en las que el principal aporte de T3 proviene de la regulación local ejercida por la D2 (Calvo, 1990; Grijota-Martinez, 2011). Según avanza el desarrollo la regulación por esta vía deja de ser tan estricta y el aporte de T3 al cerebro llegaría a ser de aproximadamente un 50% a través del paso directo de la circulación y un 50% a través de esta ruta.
- A través de la vía plexos coroideos-líquido cefalorraquídeo. Al igual que ocurre con la BHE, los plexos coroideos también expresan transportadores específicos de HT. Los tanicitos del tercer ventrículo co-expresan el transportador de HT Mct8 y D2 facilitando la conversión de T4 a T3 y su acceso a los núcleos hipotalámicos (Guadaño-Ferraz, 1997; Guadaño-Ferraz, 1999)

Por ultimo, la D3 aporta otro punto de control local de las concentraciones de T3 en el cerebro regulando su degradación en las neuronas y la respuesta a dosis elevadas de HT (Escámez, 1999; Tu, 1999; Hernandez, 2012).



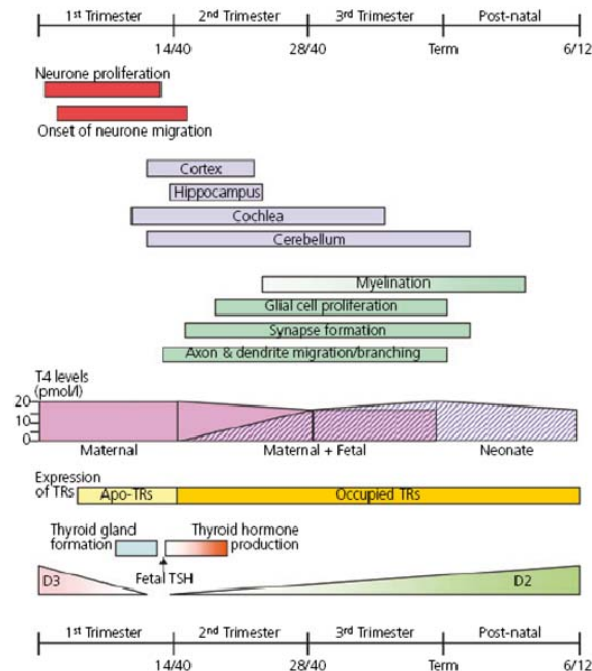


**Figura 2. Esquema del aporte de HT al cerebro a través de la barrera hematoencefálica.** Las HT procedentes del torrente sanguíneo cruzan la BHE a través de transportadores específicos como Mct8 y Oatp14. Por un lado, la T3 puede llegar directamente a las neuronas y ejercer su función reguladora en el núcleo. Por otra parte, a través del transportador Oatp14 la T4 es captada por los pies de los astrocitos que se encuentran en contacto con los capilares cerebrales. En los astrocitos, la T4 es convertida en T3 gracias a la acción de la D2 y finalmente será transportada hasta las neuronas donde ejercerá su función. La D3 en las neuronas se encarga de degradar las HT.

### 1.5 Importancia de las hormonas tiroideas en el desarrollo del SNC

Las HT son esenciales para el desarrollo del SNC. Regulan procesos tales como la neurogénesis, mielinización, proliferación dendrítica y formación de sinapsis (Bernal, 2003; Zoeller, 2004). El periodo en el que comienza la acción de las HT durante el desarrollo es crucial. Como se observa en la figura 3 se distinguen tres etapas en el desarrollo neurológico dependientes de HT (de Escobar, 2004; Morreale de Escobar, 2004). En la primera etapa no existe síntesis de HT fetales, de manera que las hormonas disponibles son exclusivamente maternas. Este periodo corresponde a las 16-20 semanas tras la concepción en humanos o el día embrionario E17.5-18 en rata. En este periodo se inicia la proliferación neuronal y la migración. El siguiente periodo comienza con la producción de HT fetales, de forma que el cerebro en desarrollo tiene un aporte de HT tanto del feto como de la madre. Los procesos que tienen lugar incluyen neurogénesis, crecimiento axonal, arborización dendrítica y sinaptogénesis, diferenciación de células gliales e inicio de la mielinización (Obregon, 2007). La tercera etapa ocurre durante el periodo neonatal y posnatal donde el aporte de HT al cerebro se debe exclusivamente al recién nacido. Es un

periodo crítico para la continuación del desarrollo. En este momento la migración de células granulares en el giro dentado del hipocampo y del cerebelo son sensibles a HT, y continúa la gliogénesis y la mielinización (Porterfield, 1993; Bernal, 2003).



**Figura 3. Acción de las HT en el desarrollo del cerebro.**

Durante el primer trimestre de gestación las HT maternas son las responsables del inicio del desarrollo neurológico. Comienza la proliferación y migración neuronal. En esta etapa la D3 ejerce un importante papel protector del feto ante un posible exceso de HT. Su actividad decrece al final de este periodo; comienza a aumentar la actividad de la D2 y comienza el desarrollo de la glándula tiroides. Al finalizar el primer trimestre se ha desarrollado el eje hipotálamo-pituitaria dando comienzo a la secreción de TSH y la producción de HT fetales. La T3 comienza a unirse a los TRs. A partir de este momento el desarrollo del cerebro en el segundo y tercer trimestre cuenta con el aporte de

HT tanto del feto como de la madre. El desarrollo cerebral continúa durante la etapa posnatal, momento en el que depende enteramente de la producción de HT neonatales. Figura modificada de la revisión de Williams G. R., 2008.

Existen diversas patologías que ponen de manifiesto la importancia de las HT durante periodos críticos del desarrollo que cursan con distinta gravedad dependiendo del momento en el que se produzca el déficit de hormonas:

- **Cretinismo:** síndrome de deficiencia mental y retraso del desarrollo ocasionado por déficit de yodo (McCarrison R., 1917). Históricamente se han distinguido dos tipos de cretinismo, frecuentemente aspectos diversos de la misma alteración. El **cretinismo neurológico**, provocado por una profunda hipotiroidemia materna debido a una alta deficiencia de yodo principalmente durante la primera mitad del embarazo. Estos pacientes presentan una glándula tiroidea y unos niveles de HT circulantes normales. No muestran signos de hipotiroidismo. Las características clínicas de estos pacientes son retraso mental profundo, sordomudez, estrabismo y diplejía espástica (DeLong,

1985). Sólo es posible prevenir este cretinismo con la administración de yodo a la madre antes del embarazo o al comienzo del mismo (Pharoah, 1972). El **cretinismo mixedematoso** se debe a un fallo en la función tiroidea del feto y neonato a partir del último trimestre de embarazo. Presentan un retraso mental menos grave que el causado por el cretinismo neurológico, con signos de hipotiroidismo: baja estatura, anomalías craneofaciales y deficiente desarrollo sexual. Este síndrome responde bien a la administración de yodo durante el último trimestre de embarazo o de hormonas tiroideas después del nacimiento (Pharoah, 1972).

- **Hipotiroidismo congénito:** se debe a un fallo congénito de la glándula tiroides. Provoca retraso mental y falta de crecimiento y desarrollo. Presenta una frecuencia de 1 cada 3000-4000 nacimientos y es la causa más frecuente de retraso mental prevenible en países industrializados. Gracias al cribado neonatal, basado en la determinación de los niveles de TSH y T4 en sangre es posible su detección precoz (Delange, 1997). El tratamiento hormonal desde el nacimiento previene efectivamente los síntomas (Dubuis, 1996).
- **Hipotiroidismo materno e hipotiroxinemia materna:** como se describe anteriormente las HT maternas cruzan la placenta y protegen el cerebro fetal durante las primeras etapas del desarrollo. Numerosos estudios han demostrado una alta incidencia de alteraciones neurológicas, trastornos por déficit de atención e hiperactividad en niños procedentes de madres hipotiroxinémicas (Pop, 1999; Vermiglio, 2004).
- **Síndromes de resistencia a HT:** se deben a causas genéticas y producen una disminución de la sensibilidad tisular a las HT. La mayoría de los casos se deben a mutaciones en el gen THRB, produciéndose alteraciones en los receptores TR $\beta$ 1 y TR $\beta$ 2, aunque recientemente se han descritos casos de resistencia por mutaciones en TR $\alpha$ . Actualmente también se consideran estados de resistencia a hormonas tiroideas a todos los defectos que interfieren con la actividad biológica de estas hormonas, incluyendo fallos en el transporte celular de T3 y T4 y alteraciones en la conversión de T4 en T3 mediada por desyodasas (Bernal, 2011).

## 2. Transporte de las hormonas tiroideas

Las HT son liberadas al torrente sanguíneo donde, en su mayoría, circulan unidas a proteínas plasmáticas: albúmina, TBG (*thyroxine binding globulin*), TTR (transtiretina) y lipoproteínas, en equilibrio con una pequeña fracción de hormona libre. Debido a su naturaleza lipofílica y a un aparente equilibrio entre las concentraciones intra y extracelulares, y con los niveles séricos, se pensaba que las HT atravesaban las membranas por difusión pasiva. Sin embargo, ha quedado demostrado la existencia de numerosos transportadores responsables de dicho mecanismo (Friesema, 2005). La aceptación generalizada de la importancia de estos transportadores tuvo lugar con la descripción de un síndrome asociado a mutaciones en el transportador de monocarboxilatos tipo 8 (MCT8): el síndrome de Allan-Herndon-Dudley, el cual describiremos en el apartado 3 (Dumitrescu, 2004; Friesema, 2004).

### 2.1 Transportadores de hormonas tiroideas

Existen cuatro familias de transportadores capaces de transportar yodotironinas con una amplia distribución tisular. Estos transportadores constituyen un nuevo mecanismo de control del metabolismo y acción de las HT.

#### 2.1.1 Familia NTCP

Familia de transportadores de aniones orgánicos dependientes de  $\text{Na}^+$ . Dentro de esta familia los más importantes son el NTCP (*Na-taurocholate cotransporting polypeptide*; SLC10A1), el transportador apical de ácido biliar dependiente de  $\text{Na}^+$  (ASBT; SLC10A2) y el transportador de aniones orgánicos dependiente de  $\text{Na}^+$  (SOAT). Hasta el momento sólo se ha demostrado el transporte de yodotironinas y yodotironinas sulfatadas de humano y rata por el transportador NTCP dentro de esta familia. Este transportador se expresa en la membrana basolateral de hepatocitos y presenta una preferencia por las HT que decrece en el siguiente orden:  $\text{T}_4 \sim \text{T}_3 > \text{rT}_3 \sim \text{T}_2$  (Friesema, 2005).

#### 2.1.2 Familia OATP (*organic anion-transporting polypeptides*)

Familia OATP (*organic anion-transporting polypeptides*), transportadores de aniones orgánicos independientes de  $\text{Na}^+$ . Representan una gran familia de proteínas multiespecíficas capaces de transportar compuestos orgánicos anfipáticos, incluyendo sales

biliares, bilirrubina, conjugados de estrógeno, HT, oligopéptidos, numerosas drogas, esteroides neutros, e incluso cationes orgánicos lipofílicos. Se han descrito alrededor de 40 OATPs en humanos, rata y ratón. Los OATPs son proteínas grandes de entre 652-848 aminoácidos con 12 dominios transmembrana, presentando los dominios amino y carboxilo terminal intracelulares. Se expresan en una gran variedad de tejidos como el hígado, riñón, cerebro (BHE y plexos coroideos), pulmones, corazón, placenta, testículos, ojos, etc. Estos transportadores parecen ser importantes en el sistema de detoxificación del organismo. Se han descrito varios OATPs capaces de transportar yodotironinas, pero quizá, el OATP más interesante en cuanto al transporte de HT sea el OATP-F en humanos y su ortólogo Oatp14 (Oatp1c1) en roedores. (Friesema, 2005). Este transportador parece ser mucho menos abundante en el cerebro humano que en el SNC de ratón (Roberts, 2008). Presenta alta afinidad para transportar T4 y rT3, pero no T3 (Pizzagalli, 2002). Al menos en ratón, el patrón de expresión en capilares de todo el cerebro (excepto en el cerebelo) y la gran afinidad por la T4 sugieren que es un transportador crucial para la entrada de T4 a través de la BHE, paso previo a la conversión en T3 en los astrocitos para finalmente ejercer su acción en las neuronas.

### 2.1.3 Familia MCT (monocarboxilatos)

Esta familia de transportadores debe su nombre a los cuatro primeros miembros identificados, los cuales transportan monocarboxilatos como lactato y piruvato. Los MCTs (o familia SLC16) facilitan tanto la entrada como la salida de sus substratos junto con un protón. Se han identificado 14 miembros de esta familia en varios tejidos de diferentes especies. Son proteínas de entre 426 y 565 aminoácidos con 12 dominios transmembrana y los extremos amino y carboxilo terminal hacia el interior de la célula. MCT1-4 se expresan en tejidos capaces de usar lactato, piruvato y cetonas como fuentes de energía. En el cerebro se utilizan como alternativa a la glucosa cuando ésta es escasa. MCT1 y MCT4 se expresan preferentemente en astrocitos mientras que MCT2 lo hace en neuronas. Esto parece indicar que MCT1 y MCT4 funcionan como exportadores de lactato de los astrocitos mientras que MCT2 sería necesario para su entrada en las neuronas (Debernardi, 2003; Rafiki, 2003). Por el momento sólo MCT8 y MCT10 han sido descritos como transportadores activos de HT (Friesema, 2003; Friesema, 2008).

El gen **MCT8** (SLC16A2) fue descrito por primera vez por Lafrenière y cols. en 1994. Se encuentra localizado en el cromosoma Xq13.2. Presenta 6 exones y codifica para una

proteína de 67kDa (Lafreniere, 1994). Consta en el amino terminal de un dominio llamado PEST que sirve como señal para una rápida degradación proteolítica. El gen MCT8 humano contiene dos posibles sitios de iniciación de la traducción (TLSs), a diferencia de otras especies incluidas rata y ratón que sólo presentan un TLS y con las que presenta una alta homología.

MCT8 se expresa en cerebro, corazón, placenta, pulmones, riñones, músculo esquelético, tiroides, hipófisis y abundantemente en hígado. En el cerebro muestra un patrón de expresión neuronal, así como una fuerte expresión en plexos coroides y BHE (Heuer, 2005; Roberts, 2008).

MCT8 es un transportador específico de yodotironinas; hasta la fecha no se ha encontrado ningún otro sustrato para este transportador. La tasa de transporte de T3 y T4 es muy alta comparada con otros transportadores de HT como los de las familias NTCP y OATPs. El transportador Mct8 de rata puede transportar T4, T3, rT3 y T2, pero no las formas sulfatadas T4NS y T4S, otros aminoácidos o lactato (Friesema, 2005). En humanos MCT8 muestra preferencia por el transporte de T3 (Friesema, 2006). El transporte de MCT8 es saturable con unos valores de Km de 4.7  $\mu\text{M}$  para T4, 4.0  $\mu\text{M}$  para T3 y 2.2  $\mu\text{M}$  para rT3 (Friesema, 2005). La importancia de este transportador en cuanto al aporte de HT al cerebro ha quedado demostrada con la identificación de mutaciones, responsables del síndrome de Allan-Herndon-Dudley, caracterizado por un grave trastorno neurológico.

#### 2.1.4 Familia HAT

Familia de transportadores heterodiméricos de aminoácidos (*heterodimeric amino acid transporters*, HATs). Se considera que los sistemas de transporte de aminoácidos aceptan grupos de aminoácidos más que aminoácidos individuales. De esta manera se habla de “sistema L” en referencia a transportadores de aminoácidos con preferencia por leucina y otros aminoácidos hidrofóbicos neutros de gran tamaño; “sistema A” si preferiblemente transportan alanina y otros aminoácidos neutros de pequeño tamaño y “sistema Asc” si prefieren alanina, serina y cisteína. Otra nomenclatura diferente propone “X” (aniónico), “Y” (catiónico) y “Z” (neutros), de tal forma que se habla de “sistema y<sup>+</sup>” para el transporte de aminoácidos catiónicos y “sistema X<sub>AG</sub><sup>-</sup>” en cuanto al transporte de aminoácidos aniónicos (Broer, 2008).

Los transportadores pertenecientes a la familia HAT están formados por una subunidad pesada (necesaria para la correcta localización del complejo en la membrana) y una subunidad ligera (encargada del transporte de aminoácidos) unidas por un puente disulfuro. Se han descrito dos tipos de subunidades pesadas: 4F2hc (también llamada CD98) y rBAT (*basic amino acid transport*), pertenecientes a la familia SLC3. Ambas son proteínas glicosiladas con un único dominio transmembrana. En cuanto a las subunidades ligeras, se han descrito 7 tipos diferentes pertenecientes a la familia SLC7 capaces de interactuar con las subunidades pesadas anteriores. Las cadenas ligeras no se encuentran glicosiladas y constan de 12 dominios transmembrana. La subunidad 4F2hc es capaz de formar heterodímeros funcionales con 6 de las 7 cadenas ligeras: LAT1, LAT2, y<sup>+</sup>LAT1, y<sup>+</sup>LAT2, Asc1 y xCT mientras que rBAT sólo es capaz de dimerizar con una cadena ligera (b<sup>0,+</sup>AT) (Friesema, 2005).

Estos transportadores se encargan de facilitar el intercambio intra y extracelular de aminoácidos. A excepción del sistema Asc, son antiportadores, al mismo tiempo que transportan un aminoácido al exterior de la célula, otro es transportado al interior celular. La localización de los transportadores heterodiméricos con la subunidad pesada 4F2 es basolateral, mientras que los asociados a rBAT se encuentran en la membrana apical (Pineda, 1999).

Los heterodímeros formados por **LAT1 (SLC7A5)** y **LAT2 (SLC7A8)** pertenecientes al sistema L (*large neutral amino acid transporters*) median el transporte de aminoácidos neutros independiente de Na<sup>+</sup>. Hasta la fecha sólo se ha demostrado transporte de yodotironinas para estos dos heterodímeros en esta familia. Friesema y cols. (Friesema, 2001) estudiaron el transporte de yodotironinas a través de estos transportadores en oocitos de *Xenopus laevis*. Demostraron que el transporte a través de LAT1 y LAT2 decrece en el siguiente orden: T2>T3~rT3>T4 (Friesema, 2001).

En lo referente al transporte de aminoácidos, LAT1 muestra preferencia por el transporte de aminoácidos neutros de gran tamaño como Leu, Tyr, Trp y Phe con alta afinidad: Km~10-20µM en ratas y Km~15-50µM en humanos. LAT2 además es capaz de transportar aminoácidos neutros de pequeño tamaño como Gly, Ala, Ser y Trh en general con afinidades más bajas que LAT1: Km~30-300µM en ratas y aproximadamente Km~300µM para la L-leucina en humanos.

Por su función de antiportadores, es probable que el papel principal de LAT1 y LAT2 sea equilibrar la distribución de aminoácidos a ambos lados de la membrana (Meier, 2002; Verrey, 2003). Ambos transportadores, LAT1 y LAT2, se expresan en varios tejidos como placenta, intestino, testículos, ovarios, riñones, estómago y cerebro. Sin embargo, LAT1 se expresa mayoritariamente en cerebro, placenta y en tumores. Esta distribución puede sugerir que esté involucrado principalmente en el transporte de aminoácidos al interior de células en crecimiento y a través de algunas barreras endoteliales y epiteliales. Por otro lado, LAT2 se distribuye abundantemente en riñón, colon e intestino, lo que parece indicar que LAT2 está más involucrado en el “*efflux*” basolateral del transporte de aminoácidos transepitelial en riñón e intestino (Rossier, 1999).

El transportador humano LAT1 presenta 507 aminoácidos con un peso molecular de ~55kDa (Mastroberardino, 1998). Adicionalmente se han descrito 2 transcritos. Uno codifica una proteína truncada de 241 aminoácidos y el otro transcrito no es codificante.

El transportador humano LAT2 consta de 535 aminoácidos con ~58kDa. Se han descrito otros 12 transcritos que probablemente codifican para proteínas truncadas de un máximo de 430 aminoácidos o son transcritos no codificantes. En ratones, Lat2 está constituido por 531 aminoácidos sin variantes de “*splicing*” descritas hasta el momento.

Basándonos en la base de datos OMIM no se han descrito enfermedades asociadas al mal funcionamiento de LAT1 o LAT2.

### **3. Síndrome de Allan-Herndon-Dudley**

El síndrome de Allan-Herndon-Dudley (AHD, ORPHA59-OMIM 300523) fue descrito en 1944 como un síndrome neurológico y de déficit intelectual profundo, ligado al cromosoma X, de etiología desconocida (Allan, 1944).

No fue hasta el año 2004 cuando dos grupos de forma independiente descubrieron mutaciones en el transportador de HT MCT8 en varias familias con problemas neurológicos (Dumitrescu, 2004; Friesema, 2004). Los síntomas de estos pacientes consistían en un retraso del desarrollo psicomotor y cognitivo, déficit intelectual profundo, falta de desarrollo del lenguaje, hipotonía de músculos axiales con evolución a espasticidad y tetraplegia e hiperquinesia paroxística. Además de estos síntomas neurológicos los



pacientes presentaban un perfil inusual de HT circulantes que consistía en unos niveles de T3 elevados y de T4 y rT3 disminuidos, mientras que la TSH se mantenía normal o ligeramente incrementada. En 2005, Schwartz y cols. realizaron un análisis de mutaciones del gen *MCT8* en 6 familias diagnosticadas con el síndrome AHD quedando claramente demostrada la asociación entre el síndrome y mutaciones en este transportador (Holden, 2005; Schwartz, 2005).

Hasta el momento se han descrito alrededor de 45 familias en todo el mundo con mutaciones en *MCT8*. Sólo se conoce un caso en el que el síndrome afecta a una mujer debido, posiblemente, a una inactivación sesgada del cromosoma X dando como resultado la pérdida de expresión de *MCT8* (Frints, 2008). Recientemente se han descrito las 2 primeras familias en España (Laura López Marín, 2013).

Las mutaciones en el transportador *MCT8* provocan cambios en la estructura y la funcionalidad de la proteína afectando a su estabilidad y modificando el mecanismo de transporte de las yodotironinas (Kleinau, 2011). La hipótesis más aceptada sobre la patogenia de esta enfermedad es que existe una deficiente entrada de T3 en las neuronas durante periodos críticos del desarrollo. Sin embargo, otros trastornos con déficit de HT como el cretinismo o el hipotiroidismo congénito provocan alteraciones de mucha menor gravedad que las ocurridas cuando *MCT8* está mutado. Incluso es de hacer notar que las mutaciones de TR $\alpha$ , no presentan grandes déficits intelectuales, aún cuando el receptor mutado posee actividad dominante negativa (Bochukova, 2012). Cabe la posibilidad de que adicionalmente existan fallos en el transporte de metabolitos no identificados todavía o de alguna otra actividad de *MCT8* independiente del transporte.

Una detección precoz de la enfermedad sería fundamental a la hora de utilizar posibles tratamientos. En la mayoría de los casos la enfermedad es diagnosticada cuando los pacientes tienen varios años de edad y presentan fallos estructurales en el cerebro difícilmente corregibles. Puesto que los pacientes presentan hipotiroxinemia se ha ensayado el tratamiento con T4 sin mejoría clínica, provocando incluso un empeoramiento del hipertiroidismo periférico. Para evitar esta complicación además se administró propiltiuracilo con objeto de bloquear la función tiroidea y normalizar las concentraciones de T4, T3 y TSH. El estado general del paciente mejoró aunque no se obtuvo una mejoría neurológica (Fuchs, 2009). Otros tratamientos han utilizado análogos de T3 como el

llamado DITPA (ácido 3,5-diiodo-tiropropiónico) capaces de cruzar la BHE en ausencia de MCT8 (Di Cosmo, 2009). Este tratamiento, aunque consigue una mejoría del estado general, no mejoró ninguno de los parámetros de afectación neurológica (Verge, 2012).

Las mujeres que presentan mutaciones en heterocigosis en el gen *MCT8* sólo son portadoras de la enfermedad y en la mayoría de los casos no presentan alteraciones cognitivas, y sólo unas mínimas alteraciones endocrinas. MCT8 se expresa en la placenta desde el primer trimestre de gestación y podría estar implicado en el transporte de HT de la madre al feto incluso cuando el feto no presente mutaciones en el transportador (Pop, 1999; Pop, 2005; Kooistra, 2006). Recientemente se ha descrito en dos mujeres heterocigotas una hipotiroxinemia gestacional que puede ser tratada para prevenir daños en el feto. Por esta razón es muy importante llevar un estricto control de los niveles de HT durante el embarazo en las madres portadoras (Ramos, 2011).

#### **4. Fenotipo de los ratones Knock-out de *Mct8***

Para estudiar la fisiopatología del síndrome de AHD causado por mutaciones en el transportador MCT8, dos grupos independientes han generado ratones deficientes de este transportador. Uno de los grupos los generó eliminando el exón 2 del gen. Con el fin de estudiar las diferencias que el fondo genético pudiera producir, utilizaron 2 fondos genéticos diferentes, C57BL/N6 y NMRI, sin encontrar diferencias entre ellos (Trajkovic, 2007). Por otro lado, el grupo del Dr. Refetoff generó ratones deficientes de *Mct8* eliminando el exón 3 en un fondo genético C57Bl/6J y posteriormente obtuvieron un fondo genético mixto C57Bl/6J:129Sv (Dumitrescu, 2006).

Los ratones knock-out (KO) de *Mct8* reproducen las alteraciones endocrinas típicas de la enfermedad: una concentración de T3 circulante elevada y de T4 y rT3 disminuidas, manteniendo normal o ligeramente incrementada la TSH. Esta situación hace que tejidos como el hígado que presentan otros transportadores de HT diferentes a *Mct8* y mantienen un rápido equilibrio con las concentraciones de hormonas circulantes se encuentren en un estado de hipertiroidismo, con unos niveles de T3 elevados y la expresión de *Dio1* (regulada por T3) también aumentada. El cuadro endocrino se explica de la siguiente manera teniendo en cuenta los mecanismos compensatorios que ocurren en ratones descritos más adelante:

- La T3 aumenta sus niveles en suero por varias razones. Por un lado, *Mct8* se expresa en tiroides y mutaciones en el mismo hacen que el tiroides secreta mayor cantidad de T3 y menor cantidad de T4 por razones aún no conocidas (Di Cosmo, 2010). La mayor concentración de T3 circulante hace que aumente la actividad de la D1 en hígado y riñones, lo que permite que la conversión de T4 en T3 incremente todavía más los niveles de T3 circulantes. Además la disminución de la entrada de T3 en cerebro y otros tejidos que expresan D3 ocasiona una menor degradación, lo que contribuye al incremento de sus niveles en sangre.

- Debido a que el tiroides secreta menor cantidad de T4 y que la conversión de T4 en T3 por la acción de la D1 en hígado y riñones está aumentada, sumado a una mayor excreción de T4 por el riñón, los niveles de T4 circulantes se mantienen disminuidos.

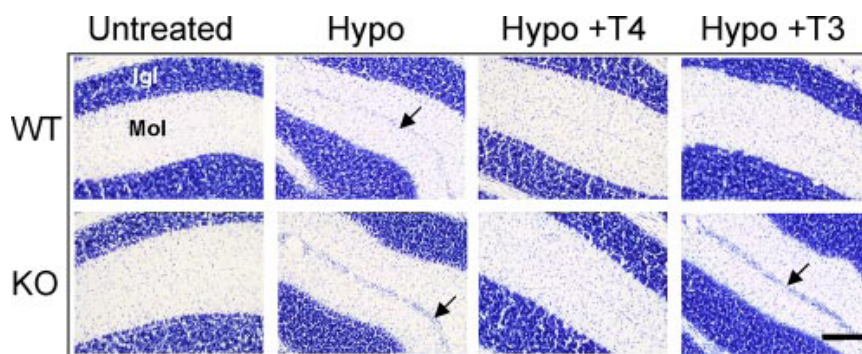
- Por ultimo, los bajos niveles de rT3 se deben, por un lado, al aumento de su degradación por la D1 en hígado y riñones, y por otra parte, a una menor producción de rT3 en tejidos como el cerebro, donde está incrementada la actividad de la D2 y disminuida la actividad D3.

Al contrario de las concentraciones circulantes, el cerebro y el cerebelo indican un estado de hipotiroidismo, con unas concentraciones de T3 y T4 disminuidas. La disminución de la concentración de T4 estimula la actividad D2, mientras que la disminución de T3 inhibe la actividad D3. Este mecanismo aumenta la eficiencia de conversión de T4 a T3, así como disminuye la degradación de ambas, aunque no llegan a conseguirse niveles de T3 normales.

Se han realizado numerosos estudios en busca de un fenotipo de hipotiroidismo cerebral en estos animales. Entre ellos pruebas de comportamiento y análisis de procesos dependientes de T3.

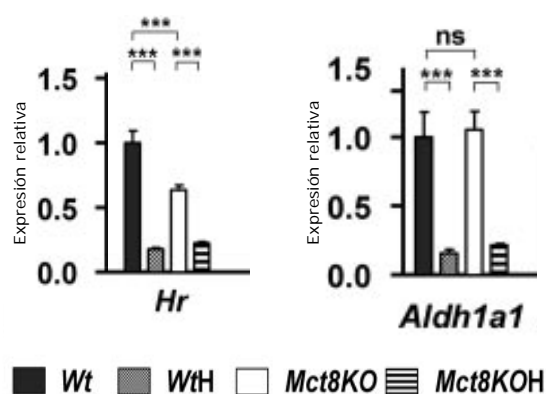
Uno de los procesos estudiados altamente dependiente de HT es el desarrollo de la estructura del cerebelo. A la edad de P21, en animales Wt, termina la migración de las células granulares, generadas en la capa germinal externa (cge), a la capa granular interna (Igl). El hipotiroidismo provoca un retraso en la migración de manera que a la edad de P21 todavía es visible la cge (Fig.4). Los ratones KO de *Mct8* presentan una estructura del

cerebelo normal como puede apreciarse en la figura 4. Además, en esta figura se observa el efecto de los tratamientos con T3 y T4 de animales hipotiroideos sobre la estructura cerebelar. Mientras que el tratamiento con T4 revierte el retraso en la migración de la cge producido por el hipotiroidismo inducido en animales KO de *Mct8*, la T3 no lo consigue. Este trabajo demostró que *Mct8* es imprescindible en la BHE para el paso de la T3 al cerebro. En cambio, la T4 puede cruzar la barrera por otros transportadores como, por ejemplo, *Oatp14* (Ceballos, 2009). Esta característica permite a los ratones KO de *Mct8* tener suficiente T4 en el cerebro, que sirve como sustrato de la D2 para su conversión a T3.



**Figura 4. Efecto del hipotiroidismo y el tratamiento con HT sobre la estructura del cerebelo de animales Wt y KO de *Mct8* a la edad de P21.** El hipotiroidismo provoca un retraso en la migración de la capa granular externa (flechas). En los animales Wt el tratamiento con T3 o T4 corrige este retraso, mientras que los ratones KO de *Mct8* solo presentan una estructura normal cuando se les trata con T4. Estos resultados indican que la T3 no es capaz de llegar al cerebelo sin un *Mct8* funcional. Igl: capa granular interna; Mol: capa molecular. Figura obtenida de Ceballos, A. y cols. (Ceballos, 2009).

Otro proceso dependiente de HT estudiado en los animales deficientes de *Mct8* es la expresión de genes regulados por T3. Trabajos anteriores del laboratorio han proporcionado una batería de genes dependientes de T3. Estos genes se seleccionaron en función de las alteraciones que provocaba el hipotiroidismo sobre su expresión génica (Morte, 2010). Posteriormente, se analizó la expresión de los genes seleccionados en la corteza cerebral de los ratones KO de *Mct8*. Estos animales presentaban un ligero hipotiroidismo parcialmente compensado en genes como *Hr* o *Cbr2*, o totalmente compensado en el resto de genes analizados (ej. *Aldb1a1*) (Fig.5). Decimos que presentan un hipotiroidismo parcial o totalmente compensado porque en ningún caso llegan a tener una expresión génica similar a la del hipotiroidismo franco inducido en los animales Wt y en los KO de *Mct8* (Morte, 2010).



**Figura 5. Efecto de la deficiencia de Mct8 y del hipotiroidismo sobre la expresión génica en corteza cerebral.**

La drástica reducción en los niveles de expresión génica en animales Wt hipotiroides permitió seleccionar una batería de genes dependientes de HT (se muestran dos ejemplos: *Htr* y *Aldh1a1*). Los ratones KO de *Mct8* conservan una expresión génica normal (*Aldh1a1*) o ligeramente disminuida (*Htr*) de los genes seleccionados, lo que indica que existe

una compensación total o parcial de las concentraciones de HT. Estos animales tienen suficiente T3 en la corteza cerebral para regular su expresión génica y tan sólo cuando se les induce un hipotiroidismo franco sus niveles de expresión génica disminuyen al nivel de los animales Wt hipotiroides. Wt: ratones Wt; WtH: ratones Wt hipotiroides; Mct8KO: ratones deficientes de Mct8; Mct8KOH: ratones deficientes de Mct8 hipotiroides. Datos obtenidos de Morte, B. y cols. (Morte, 2010).

Las pruebas de comportamiento tampoco revelaron alteraciones en la locomoción ni en la coordinación de animales KO de *Mct8*, aunque presentaron menor ansiedad (Wirth, 2009).

Por tanto, a pesar del menor contenido de HT en el cerebro, estos ratones no reproducen las características neurológicas observadas en los pacientes ni muestran un fenotipo de hipotiroidismo cerebral.

La diferencia de fenotipo entre humanos y ratones con mutaciones en Mct8 puede deberse a que los ratones, pero no los humanos, presenten transportadores alternativos a Mct8 que puedan suplir su función. Los transportadores conocidos con mayor probabilidad de estar implicados en esta compensación son el Lat2 y el Oatp14. Por un lado, se ha descrito que el transportador Lat2 en ratones se expresa altamente en neuronas en desarrollo, mientras que en humanos sólo se expresa en neuronas de adulto. En fetos humanos la expresión de *LAT2* se encuentra fundamentalmente en la microglía (Pineda, 1999; Chan, 2011). Por otra parte, se piensa que el transportador Oatp14 puede tener un importante papel en la entrada de HT al cerebro. En roedores Oatp14 se expresa fuertemente en células endoteliales de cerebro y plexos coroideos (Sugiyama, 2003; Tohyama, 2004), mientras que Roberts y cols. (Roberts, 2008) demostraron que en el cerebro humano OATP14 se expresa muy débilmente en capilares. Estas diferencias de expresión podrían suponer la falta de acceso de T3 a las neuronas durante periodos críticos

del desarrollo provocando las graves alteraciones estructurales y funcionales del cerebro de pacientes AHD. También cabría la posibilidad de que en humanos MCT8 tenga alguna función no descrita hasta el momento o que transporte algún sustrato aún sin identificar.

## 5. Fenotipo de ratones Knock-out de *Lat2*

Dos grupos independientes han generado ratones deficientes de *Lat2*. El grupo del Dr. Palacín (Universidad de Barcelona) trabaja con el objetivo de determinar los mecanismos moleculares implicados en la reabsorción renal e intestinal de aminoácidos. Han generado ratones deficientes del transportador de aminoácidos *Lat2* (Slc7a8) en un fondo genético mixto de C57/129Ola. La descripción del fenotipo de estos ratones en lo referente a su función de transporte se publicará por Font-Llitjós M, Espino M, otros (manuscrito en preparación).

Por otro lado, el Dr. Schweizer (Charité –Universitätsmedizin, Berlín) generó ratones KO de *Lat2* en un fondo genético C57Bl/6 (Braun, 2011b). El estudio publicado con estos ratones ha revelado un incremento en la pérdida urinaria de aminoácidos neutros de pequeño tamaño. Sin embargo, el desarrollo y crecimiento de los animales era normal sugiriendo que existe una compensación funcional del transporte de aminoácidos neutros por otros transportadores en riñones, intestino y placenta. La deficiencia de *Lat2* no causaba alteraciones en los niveles circulantes de HT ni de TSH. Los animales presentaban un desarrollo y estructura del cerebelo sin alteraciones, así como tampoco detectaron cambios en el tamaño, estructura, expresión de marcadores neuroquímicos y expresión de genes dependientes de T3 en el cerebro. En contraste, observaron una ligera disminución en la coordinación motora. Se puede concluir que el aporte de HT en estos ratones es suficiente, lo que se explica porque el principal aporte de hormonas ocurre a través de *Mct8*. Se propone que el fallo motor se debe a una alteración en el ciclo cerebral de la glutamina/glutamato como consecuencia de una disminución del flujo de alanina la cual se ha sugerido como fuente de amonio en este ciclo. Según esta teoría los astrocitos toman el glutamato extracelular y lo convierten en glutamina, la cual es transportada hasta las neuronas donde se convierte en glutamato. *Lat2* podría estar implicado en la entrada de alanina en los astrocitos. Mutaciones en este transportador no permitirían el correcto aporte de alanina impidiendo, por tanto, un adecuado ciclo glutamina/glutamato cerebral (Broer, 2007; Edwards, 2007).

Objetivos





Con el objetivo final de descubrir las causas de la ausencia de alteraciones neurológicas en ratones *knock-out* de *Mct8* en contraste con los graves síntomas observados en pacientes con mutaciones en el transportador de hormonas tiroideas MCT8, hemos generado ratones dobles *knock-out* de *Mct8/Lat2*.

El principal objetivo de este trabajo ha sido evaluar la capacidad del transportador Lat2 de actuar como transportador alternativo de hormonas tiroideas en ausencia de Mct8.

Hemos analizado el efecto de la delección de *Lat2* sobre la acción de las hormonas tiroideas en cerebro y el efecto que provoca la delección adicional de este transportador en animales *knock-out* de *Mct8*. Los análisis los hemos realizado en ratones de edad adulta y en ratones de edades posnatales tempranas para determinar posibles alteraciones dependientes del momento del desarrollo.



## Materiales y Métodos



## 1. Animales de experimentación

Se utilizaron ratones con fondo genético mixto C57Bl/6J:129Sv (KO de *Mct8*) y C57/129Ola (KO de *Lat2*) como se describen en los apartados siguientes. Los animales fueron criados en el animalario del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” de Madrid, manteniéndolos en habitaciones con una temperatura controlada (22-24 °C), ciclos alternativos de luz-oscuridad de 12h y con libre acceso a comida y agua. Los animales se sometieron a control veterinario siguiendo las directivas de la Unión Europea (86/609/CEE y 2010/63/UE) según procedimientos aprobados por el comité ético de la institución. Todos los protocolos realizados con los animales han sido aprobados por dicho comité.

### 1.1 Obtención de los ratones knock-out de *Mct8* y su genotipado

Los ratones deficientes de *Mct8* fueron generados en el laboratorio del Dr. Samuel Refetoff en la Universidad de Chicago (Dumitrescu, 2006). Mediante recombinación homóloga se consiguió la delección del exón 3 del gen *Mct8* (*Slc16a2*) localizado en el cromosoma Xq13.2 sobre un fondo genético C57Bl/6J. Posteriormente los cruzaron con ratones de fondo genético 129Sv para obtener ratones KO de *Mct8* con un fondo genético mixto C57Bl/6J:129Sv. Para esta tesis se han utilizado los ratones con fondo genético mixto. El genotipo de estos ratones fue confirmado mediante PCR (36 ciclos: 94°C 30seg.; 62°C 40seg.; 72°C 40seg.) a partir de ADN extraído de 2mm de cola. Los cebadores utilizados son: iniciador común (5'-ACAGAGCAAGTTCCAAGACA-3'); reverso específico para el mutante (5'-GAGAGCAGCGTAAGGACAAA-3'); y reverso específico para el Wt (5'-CTCCCAAGCCTGATTTCTAT-3'). Como resultado se obtiene un fragmento amplificado de 573 pares de bases (pb) correspondiente al alelo Wt y otro de 325pb correspondiente al alelo mutado.

### 1.2 Obtención de los ratones knock-out de *Lat2* y su genotipado

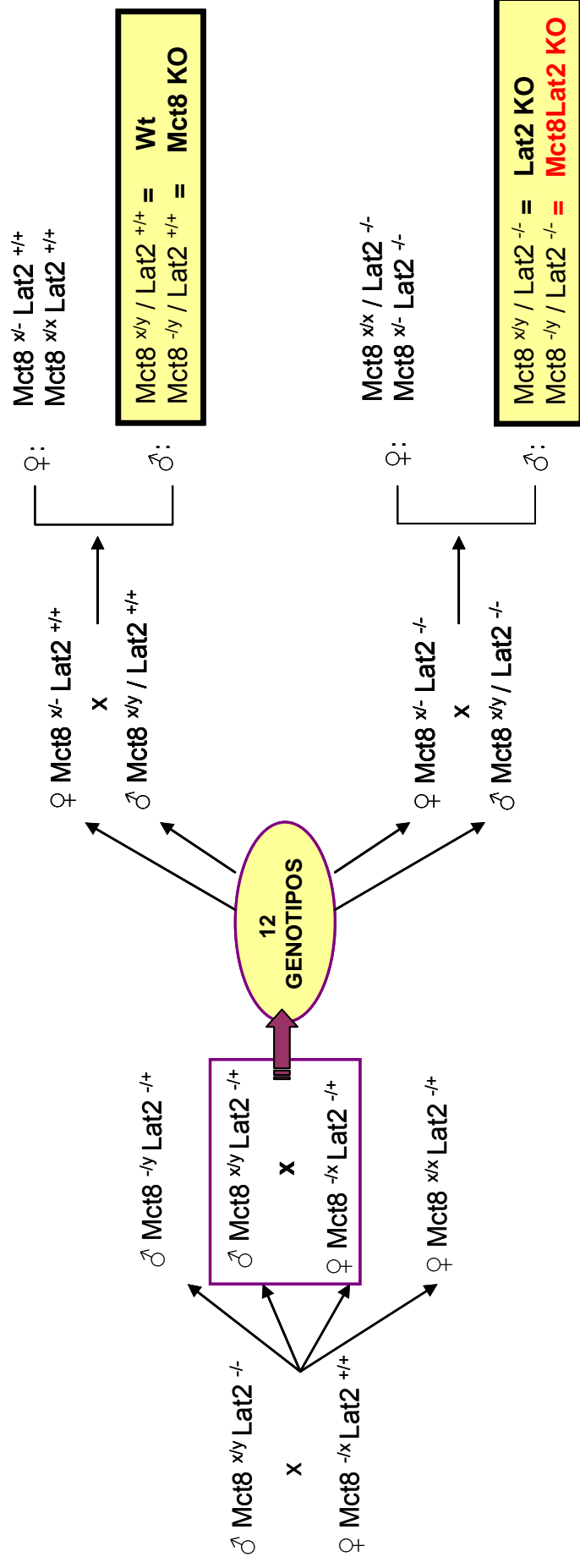
Los ratones deficientes de *Lat2* utilizados fueron generados y cedidos por el laboratorio del Dr. Manuel Palacín y Virginia Nunes de la Universidad de Barcelona e IDIBELL respectivamente. Generaron los ratones KO de *Lat2* sobre un fondo genético mixto C57/129Ola mediante recombinación homóloga; reemplazando parte del promotor y el exón 1 del gen *Slc7a8* (*Lat2*) por el gen de resistencia a neomicina. Cruzaron 8 quimeras macho con hembras C57Bl/6J para obtener la F1. Los heterocigotos (*Slc7a<sup>+/−</sup>*) de la F1

fueron cruzados entre ellos para obtener los 3 posibles genotipos con una frecuencia mendeliana. Una descripción más detallada del proceso y la completa caracterización del fenotipo de estos animales será publicada por Font-Llitjós, M. y cols (Font-Llitjós M). El genotipo de *Lat2* fue confirmado por PCR de ADN procedente de 2mm de cola utilizando los mismos ciclos que para el genotipado de *Mct8* y usando los cebadores: iniciador común (5'-GGAGCGATCTGCGGAGTGA-3'); reverso específico para el mutante (5'-CGGTGGGCTCTATGGGTCTA-3') y reverso específico del Wt (5'-ACAGAGTGCCTCCTACCCT-3'). Este proceso genera un fragmento de 457pb correspondiente al alelo Wt y uno de 180pb correspondiente al alelo mutado.

### 1.3 Obtención de los ratones dobles knock-out de *Mct8Lat2*

Para la obtención de los ratones dobles KO de *Mct8Lat2* cruzamos los animales KO de *Mct8* con los animales KO de *Lat2* de la siguiente manera:

Comenzamos cruzando machos KO de *Lat2* con hembras *Mct8* heterocigotas (portadoras de *Mct8*) (Fig.6). De este cruce en la F1 se obtienen 4 genotipos diferentes, de los cuales cruzamos los machos *Lat2* heterocigotos y *Mct8* silvestres (wild type, Wt) con las hembras *Lat2* Wt y *Mct8* heterocigotas de manera que en la F2 se consiguen 12 genotipos diferentes entre los que se encuentran los machos dobles KO de *Mct8Lat2*. Para todos los experimentos realizados en esta tesis se han utilizado ratones machos. Con el fin de conseguir que todos los machos de la progenie tuvieran el genotipo necesitado realizamos dos tipos de cruces. En uno de ellos cruzamos machos Wt con hembras portadoras de *Mct8/Lat2* Wt para conseguir machos Wt y KO de *Mct8*. Por otro lado, cruzamos machos *Mct8* Wt/*Lat2* KO con hembras portadoras de *Mct8/Lat2* KO para obtener machos KO de *Lat2* y dobles KO *Mct8Lat2*. En todos los experimentos se han utilizado un mínimo de 6 animales.



**Figura 6. Esquema de los cruces realizados para la obtención de animales dobles knock-out (KO).** Se comenzó cruzando machos KO de *Lat2* con hembras portadoras de *Mct8*. De los 4 genotipos obtenidos en este cruce se cruzaron machos *Mct8* Wt/*Lat2* heterocigotos con hembras portadoras de *Mct8*/*Lat2* heterocigotas consiguiendo 12 genotipos diferentes entre los que se encuentran los dobles KO. Para los experimentos realizados en esta tesis se realizaron sistemáticamente 2 tipos de cruces: macho *Mct8* Wt/*Lat2* Wt con hembra *Mct8* portadora/*Lat2* Wt y machos *Mct8* Wt/*Lat2* KO con hembra *Mct8* portadora/*Lat2* KO. Del primer tipo de cruce se obtienen machos Wt y KO de *Mct8* y del segundo tipo de cruce se obtienen machos KO de *Lat2* y dobles KO de *Mct8Lat2*.

## 1.4 Tratamiento: Inducción de hipotiroidismo

La inducción del hipotiroidismo se realizó añadiendo al agua de bebida de los animales MMI (2-mercapto-1-metil imidazol; Sigma) al 0,02% y perclorato potásico ( $\text{KClO}_4$ , Merck) al 1% desde el día embrionario de gestación 9 (E9) en el caso de la obtención de ratones hipotiroideos a la edad posnatal de 21 días (P21) o durante un periodo de 3 semanas antes del sacrificio en el caso de los animales adultos. Estos compuestos son drogas antitiroideas; el MMI inhibe la yodación de la tiroglobulina y el  $\text{KClO}_4$  inhibe el transporte de yoduro al interior de los tirocitos.

## 1.5 Sacrificio y obtención de muestras

Dependiendo del estudio al cual iba destinada cada muestra o tejido se realizó un determinado sacrificio de los animales:

### 1.5.1 Extracción de tejidos para obtención de ARN y para la determinación de las concentraciones de hormonas tiroideas

Para la obtención de tejido para extracción de ARN y determinación de las concentraciones hormonales los ratones fueron decapitados. Rápidamente se recogió una muestra de hígado y se extrajo el encéfalo del cráneo separándolo en sus distintas regiones: corteza, hipocampo, estriado y cerebelo. Inmediatamente se congelaron en hielo seco y se almacenaron a  $-80^\circ\text{C}$ . En el caso de la obtención de tejido de animales recién nacidos (P0) sólo fue posible separar las cortezas cerebrales y los hígados.

### 1.5.2 Extracción de tejidos para técnicas histológicas

La extracción de tejidos para técnicas histológicas se realizó mediante perfusión de los animales. Los ratones fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (5mg/100gr de peso corporal; Ketolar, Pfizer) y medetomidina (0,01mg/100gr de peso corporal; Domtor, Pfizer) mediante inyección intraperitoneal. La perfusión se realizó a través del ventrículo izquierdo vía aorta ascendente con paraformaldehído (Merck) al 4% en tampón fosfato 0,1M, pH 7,4 (PF 4% PB 0,1M). Tras la perfusión se decapitó a los animales para extraer el cerebro completo. Se realizó una post-fijación de 24h en PF 4% PB 0,1M a  $4^\circ\text{C}$  y una crioprotección con PF 4% PB 0,1M más sacarosa al 30% a  $4^\circ\text{C}$ . Los animales de edad P0 fueron decapitados y los cerebros fueron extraídos e incluidos directamente en PF 4% PB 0,1M para su fijación y crioprotección. Posteriormente fueron congelados rápidamente en



hielo seco y almacenados a -80°C. Se realizaron cortes coronales del cerebro y sagitales del cerebelo al criostato de 25µm de grosor. Los cortes fueron recogidos y almacenados a -80°C en una solución crioprotectora conteniendo 30% etilen-glicol y 30% glicerol en tampón fosfato 0,1M hasta su utilización. Los tejidos de tiroides utilizados fueron cedidos por la Dra. Ana Sastre. Tras una rápida extracción fueron directamente congelados en OCT, cortados al criostato sobre porta y almacenados a -80°C hasta su utilización.

### 1.5.3 Extracción de sangre para la obtención de plasma

La obtención de sangre se obtuvo de todos los animales que fueron decapitados. La sangre fue recogida en tubos heparinizados y centrifugada a 3000 rpm durante 20 min. a temperatura ambiente. El plasma (fase superior) se recogió y se almacenó a -80°C.

## 2. PCR en tiempo real

La extracción de ARN total se llevó a cabo mediante el método de Trizol (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante y con una extracción de cloroformo adicional. La calidad del ARN se analizó con un bioanalizador (Agilent, Santa Clara, CA). El ADNc fue preparado a partir de 250ng de ARN mediante el kit “*High capacity cDNA reverse transcription*” (Applied Biosystems). Para la reacción de PCR se utilizó una cantidad de ADNc equivalente a 5ng/µl de ARN inicial. La reacción de PCR en tiempo real fue llevada a cabo en un volumen final de 10µl con la solución “TaqMan universal PCR master mix, No Amp Erase UNG” en un termociclador “7900HT *Fast real-time PCR system*” (Applied Biosystems). El programa de PCR utilizado consistió en un paso inicial de 95°C durante 10min seguido de 40 ciclos (95°C 15seg, 60°C 1min). Las PCRs se realizaron en triplicados utilizando el gen 18S como control endógeno (su expresión es constante en todas las condiciones experimentales utilizadas). El análisis fue realizado con el método 2-Ct. Los resultados obtenidos se expresaron como valores relativos a los obtenidos para la muestra control (Wt) a la cual le fue asignado el valor de 1 tras la corrección por el 18S. A continuación se muestran las sondas TaqMan (Applied Biosystems) utilizadas:

Código	Abreviatura	Nombre completo del gen
Mm00437796_m1	Bcl2l11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)
Mm00618780_m1	Cadm2	cell adhesion molecule 2
Mm00487160_m1	Col6a1	collagen, type VI, alpha 1
Mm00438355_m1	Cxadr	coxsackie virus and adenovirus receptor
Mm00444699_m1	Cxcl14	chemokine (C-X-C motif) ligand 14
Mm00517363_m1	Dbc1	deleted in bladder cancer 1 (human)
Mm00488080_m1	Dhrs3	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3
Mm00839358_m1	Dio1	deiodinase type 1
Mm00515664_m1	Dio2	deiodinase type 2
Mm00548953_s1	Dio3	deiodinase type 3
Mm00513052_m1	Flywch2	flywch family member 2
Mm00497606_m1	Gbp3	guanylate binding protein 3
Mm01164862_m1	Gls2	glutaminase 2 (liver, mitochondrial)
Mm00498963_m1	Hr	hairless
Mm00434548_m1	Itih3	inter-alpha trypsin inhibitor, heavy chain 3
Mm00495172_m1	Klf9	kruppel-like factor 9
Mm00441516_m1	Lat1, Slc7a5	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 5
Mm00444250_m1	Lat2, Slc7a8	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 8
Mm01266402_m1	Mbp	myelin basic protein
Mm00486204_m1	Mct8, Slc16a2	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 2
Mm00456201_m1	Nefm	neurofilament, medium polypeptide
Mm00451845_m1	Oatp14, Slco1c1	solute carrier organic anion transporter family, member 1c1
Mm00452449_m1	Oatp3a1, Slco3a1	solute carrier organic anion transporter family, member 3a1
Mm00441361_m1	Sema7a	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), and GPI membrane anchor, (semaphorin) 7A
Mm00436528_m1	Shh	sonic hedgehog
Mm00600697_m1	Slc1a3, GLU-T	solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 3

### 3. Hibridación *in situ* radiactiva

El protocolo se realizó con cortes de cerebro de 25µm de grosor en flotación utilizando placas de 24 pocillos para la hibridación siguiendo el protocolo descrito por (Bernal, 2002). La ribosonda de *Mct8* fue diseñada por Ainhoa Ceballos a partir de ADNc de *Mct8* (NM\_009197.2; nucleótidos 640-1410). La ribosonda de *Lat2* (NM\_016972.2; nucleótidos 1824-2213) fue sintetizada a partir de 390pb de ADNc conseguido mediante amplificación por PCR utilizando los siguientes cebadores: forward 5'-GCCTGCTGT'TTCCCAT'TATC-3', reverse 5'-CAGGAATACAGGGCAGAAAG-3'. El

marcaje de las ribosondas se realizó utilizando  $^{35}\text{S}$ -UTP en una reacción de transcripción *in vitro* con los ADNc anteriores. Posteriormente fueron purificadas en columnas *Chromaspin 100* (Clontech). La hibridación de los tejidos se realizó con una concentración de ribosonda de  $9 \times 10^6$  cpm por cada 500  $\mu\text{l}$  de buffer de hibridación en cada pocillo durante toda la noche a 55°C. Tras la hibridación, el exceso de sonda y la sonda unida inespecíficamente fue eliminada con lavados de temperaturas crecientes hasta 68°C. Últimos lavados con PBS. Los cortes fueron montados y posteriormente deshidratados con lavados de 3 min en 50, 70 y 96% de etanol, todos conteniendo  $\text{NH}_4\text{OAc}$  0,3M más un lavado de 10 segundos en etanol 100%. Fueron expuestos a una película autorradiográfica de alta sensibilidad (BioMax, Kodak) durante 6 días.

#### **4. Inmunohistoquímica**

La inmunohistoquímica de cerebros fue realizada en flotación, mientras que la inmunohistoquímica de tiroides frescos se realizó sobre porta. En primer lugar se realizaron 3 lavados de 5min con PBS para eliminar la solución crioprotectora de los cortes de cerebro. Los tiroides fueron fijados 7 min con PF 4% PB 0,1M en frío. Posteriormente se bloquearon las peroxidases endógenas con un lavado de 15 min con metanol al 10% más  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 3% en PBS. Se incubaron durante 1h en solución de bloqueo (BSA 4%; Triton-X-100 0,05% para cerebros/0,1% para tiroides; suero 5%; lisina 0,1M en PBS) y con el anticuerpo primario Lat2 cedido por el Dr. Manuel Palacín a una dilución 1:700 en PBS 1x, BSA 4%; Triton-X-100 0,05% para cerebros/0,1% para tiroides; suero 1%; O-N a 4°C durante toda la noche a 4°C. Tras lavados en PBS se utilizó el anticuerpo secundario biotinilado 1:200 en PBS 1x, BSA 4%; Triton-X-100 0,05% para cerebros/0,1% para tiroides; suero 1% durante 1h. Revelado con DAB (diaminobenzidina) 0,5 mg/ml, 0,01%  $\text{H}_2\text{O}_2$  en PBS. Se montaron los cortes y se deshidrataron en series de etanol al 50, 70, 96 y 100% de etanol (2min).

#### **5. Hibridación *in situ* radiactiva combinada con inmunohistoquímica y revelado con emulsión autorradiográfica.**

Para esta técnica la hibridación *in situ* se realizó como se explica en el apartado 3 sin llegar a montar los cortes, dejándolos en el último lavado con PBS. A continuación se pasó a incubar directamente con la solución de bloqueo (BSA 4%; Triton-X-100 0,05%; suero 5%; lisina 0,1M en PBS) sin realizar el paso de bloqueo de las peroxidases. Los siguientes pasos se describen en el apartado 4. Anticuerpos primarios NeuN 1:500 (Chemicon;

Millipore), GFAP 1:2000 (Sigma) y PDGFR $\alpha$  1:500 (Santa Cruz Biotechnology). Anticuerpo secundario biotinilado 1:200. Revelado con DAB (diaminobenzidina) 0,5 mg/ml, 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en PBS. Los cortes se montan y se deshidratan con lavados de 2min en 50, 70 y 96% de etanol, todos conteniendo NH<sub>4</sub>OAc 0,3M más un lavado de 10 segundos en etanol 100%. Se dejan secar y se procede a realizar el revelado mediante emulsión autorradiográfica NTB (Kodak) siguiendo instrucciones del fabricante. Tiempo de exposición de la emulsión 12-15 días. Revelado de la emulsión sin agitación y a 16°C con 4min de revelador D19 (Kodak), 30seg en agua y 5 min en fijador (P6557-1GA, Kodak). Tras lavar con agua fría durante 30min se vuelven a deshidratar los cortes con lavados de 3min en 50, 70 y 96% etanol+ NH<sub>4</sub>OAc 0,3M, 2 lavados de 100% etanol y uno en Xilol. Montaje con Depex.

## **6. Tinción de Nissl**

Esta técnica nos ha permitido el estudio de la migración de las células granulares de cortes sagitales de cerebelo. La técnica se realizó con los cortes montados sobre porta. La preparaciones se dejaron 1h en alcohol 70% seguido de un lavado de 5min con agua y 15 min en Azul de Toluidina al 0,1% (Merck) en solución de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> al 1,4% (Riedel Haën) y ácido cítrico al 1,3% (Merck) pH 4. Con lavados de agua se eliminó el exceso de colorante y posteriormente se deshidrataron las preparaciones con lavados de etanol al 50, 70, 96 y 100% durante 2min y se clarificaron en xilol 5min. Finalmente se cubrieron las preparaciones con DePex (Serva).

## **7. Determinación de T3 y T4 en tejidos y plasma mediante radioinmunoensayo (RIA)**

Las determinaciones de T3 y T4 se realizaron en colaboración con la Dra. María Jesús Obregón del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” de Madrid.

### **7.1 Síntesis de T3 y T4 marcadas radiactivamente y extracción de HT de los tejidos**

Para la utilización en los ensayos de los RIA se sintetizaron T3 y T4 radiactivas con I<sup>125</sup> con una alta actividad específica (3000-1500  $\mu$ Ci/ $\mu$ g). Para la síntesis se siguió el método descrito por (Weeke, 1973). Los productos del marcaje se separaron por cromatografía en papel con butanol-metanol-amoniaco según (Obregón, 1978).

La extracción de T3 y T4 de los plasmas y tejidos se realizó siguiendo el protocolo descrito por (Gordon, 1982) con las modificaciones añadidas por (Morreale de Escobar, 1985). Puesto que sólo hemos utilizado un isótopo ( $I^{125}$ ) para el marcaje de T3 y T4, el porcentaje de recuperación lo calculamos añadiendo a la mitad de las muestras 2000 cpm de T3 marcada con  $I^{125}$  y a la otra mitad 2000 cpm de T4- $I^{125}$  como trazadores internos. La extracción se realizó con metanol-cloroformo (1:2) en  $Cl_2Ca$  al 0,05 % y la purificación de los extractos obtenidos se obtuvo mediante cromatografía de intercambio iónico en columnas de resina Dowex 50W-X2 (Bio-Rad) y su posterior elución con ácido acético al 70%. La radiactividad de la fracción resultante se cuantificó en un contador gamma para calcular la recuperación de T3- $I^{125}$  y T4- $I^{125}$  en las distintas muestras analizadas. La media de la recuperación obtenida con las muestras de T3- $I^{125}$  fue utilizada en la otra mitad de las muestras que tenían T4- $I^{125}$  y viceversa. Los eluidos se evaporaron y fueron resuspendidos en tampón de RIA (PB 0,04 M pH8 con BSA al 0,2 % y mertiolato 0,6 mM) y congelados hasta su posterior análisis en los RIA.

## 7.2 Determinación de T3 y T4 en extractos de plasma y tejidos

Para la realización de los RIA de T3 y T4 se utilizó el método de (Weeke, 1975) con las modificaciones añadidas por (Obregón, 1978; Morreale de Escobar, 1985) utilizando anticuerpos específicos (Ruiz de Oña, 1991). Cada muestra se ensayó por duplicado. A cada una se le añadieron 100µl de tampón de RIA con 6000 cpm de T4- $I^{125}$  ó T3- $I^{125}$  y 100 µl del antisuero específico (en una dilución 1/300.000 para T4 y 1/150.000 para T3). Después de 12-24 h de incubación se añadieron 1,5ml de tampón de RIA con 90mg de polietilenglicol 6000 y 45µl de suero bovino. Los complejos antígeno-anticuerpo se precipitaron por centrifugación y se contó la radiactividad. En cada ensayo se prepararon curvas patrón de T3 y T4. La curva patrón del RIA de T3 cubrió el rango de 1,5 a 100pg, siendo el límite de detección de 1,5 pg/tubo. La curva patrón del RIA de T4 cubrió el rango de 2,5 a 320pg, siendo el límite de detección de 2,5 pg/tubo. Las concentraciones de cada hormona en la muestra inicial se calcularon teniendo en cuenta el peso de la muestra original homogeneizada o el volumen de la misma en el caso de los plasmas, la recuperación de los trazadores durante el proceso de extracción y el volumen de cada alícuota en los RIA.

Todas las medidas se realizaron con un mínimo de 6-8 muestras por grupo. En el caso de las muestras de animales P0 se hicieron pules de 2 ó 3 animales para obtener entre 8 y 11 puntos por cada grupo.

## 8. Determinación de la actividad D2 en corteza cerebral

Las determinaciones de las actividades de D2 se realizaron en colaboración con la Dra. María Jesús Obregón del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” de Madrid, siguiendo el método de Leonard (Leonard, 1980) con modificaciones adaptadas por la propia Dra. María Jesús Obregón (Hernández, 1996).

Antes de la realización del ensayo, se sintetizó T4-I<sup>125</sup> y se purificó para eliminar el I<sup>125</sup>-yoduro contaminante. Esta purificación se realizó por electroforesis en tiras de 2cm de papel Whatmann 3MM durante 5 minutos a 400V, usando como solvente acetato amónico (50mM), pH 6,8. El yoduro migra unos 3-4cm, mientras que la T4-I<sup>125</sup> permanece en el origen de aplicación de donde se eluyó con NaOH (0,04 N). Este proceso permite la recuperación de aproximadamente el 50% de la yodotironina marcada y libre de yoduro (menos del 1% de la radiactividad proviene del yoduro residual).

Los tejidos fueron homogeneizados en 1ml de tampón de homogeneización conteniendo sacarosa (0,32M), ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES; 10mM) a pH=7 y ditiotretol (DTT; 10mM). La actividad de la D2 se midió en un volumen final de 100µl que contenía: 50µl del homogeneizado de cada muestra, 100.000cpm T4-I<sup>125</sup> y T4 (2nM) como sustrato, T3 (1µM) para inhibir la desyodación de la T4 en posición 5 (en el anillo interno por acción de la D3), tampón fosfato (100mM; pH 7), ácido etilendiamino-tetracético (EDTA; 1mM) y 6-propil-2-tiouracil (PTU; 1mM) para inhibir la actividad 5' de D1 y DTT (50mM). Tras una incubación de 1 hora a 37°C se paró la reacción añadiendo 50µl de una mezcla (1:1) de suero de ternera con PTU (10mM). Posteriormente se añadieron 350µl de ácido tricloroacético (TCA) al 10% precipitando las proteínas por centrifugación (1000g, 30 min a 4°C). La separación del yoduro y de la yodotironina residual (no precipitada con el suero y el TCA) se realizó por cromatografía de intercambio iónico. Esto se realizó pasando 400µl del sobrenadante anterior por columnas rellenas de Dowex 50W-X2 (Bio-Rad) que habían sido equilibradas con ácido acético al 10 %. 2ml de este mismo ácido acético 10% se utilizaron para la elución. Se contó la radioactividad I<sup>125</sup>-yoduro y la actividad enzimática se obtuvo restando al valor de cada muestra la desyodación no enzimática. Ésta se estimó incubando el blanco con la solución de homogeneización (sin tejido) y calculando el porcentaje de T4-I<sup>125</sup> desyodada como fracción de los 200 femtomoles usados por hora y mg de proteína. La concentración de proteína de las muestras se determinó por el método de Lowry (Lowry, 1951)

precipitando los homogeneizados tisulares con TCA al 10% para evitar la interferencia colorimétrica del DTT en el ensayo.

## 9. Determinación de TSH

Las determinaciones de TSH fueron realizadas en colaboración con el Dr. Samuel Refetoff en la Universidad de Chicago siguiendo el método descrito por (Pohlenz, 1999).

## 10. Estudio de comportamiento: Rotarod

La prueba del rotarod se utilizó para evaluar el equilibrio y la coordinación motora de los distintos ratones KO. Para la realización de la prueba se siguió el protocolo descrito por Pallier y cols. (Pallier, 2009) con pequeñas modificaciones. El rotarod (Accelerating model, Ugo Basile) se programó para aumentar la aceleración de 4 rpm hasta 44 rpm en 180 segundos y posteriormente continuar a velocidad constante de 44 rpm durante 120 segundos más, completando así un ciclo de 5 min por ensayo. Con cada ratón se realizó un día de aprendizaje dejándoles 1 minuto sobre el rotarod. Si se caían del rotarod se les volvía a subir. Seguido de este día de aprendizaje se realizaron 5 días consecutivos de ensayo, repitiendo la prueba 3 veces al día con intervalos de 30 min entre cada ensayo. Se midió la latencia de caída del rodillo. Para el análisis estadístico se utilizó el valor máximo de latencia de caída de cada ratón por día. A los ratones que permanecieron en el cilindro sin caer los 5 minutos que duró la prueba se les concedió el valor máximo de 300 segundos. Se utilizaron 17 animales Wt, 13 animales dobles KO y 8 KO de *Lat2* de 8 meses de edad.

## 11. Análisis estadístico de los resultados

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo con el programa GraphPad Prism 5 ([www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) expresando los resultados como la media  $\pm$ SEM (error estándar de la media). Para comparaciones entre dos grupos se utilizó el análisis estadístico “*unpaired T-test*” y para comparaciones múltiples se utilizó el análisis de varianza ANOVA de una o dos vías dependiendo del experimento. En el caso de los experimentos con animales P0 y P5 donde la influencia de los diferentes genotipos de la madre podría interferir sobre los resultados se utilizó el análisis estadístico MANOVA (Modelo lineal generalizado) con el programa SPSS. Los post-test que se aplicaron fueron el “*test de Tukey*” o el “*test de Bonferroni*” para valorar las diferencias entre los grupos. El nivel de significancia estadística se estableció en  $P \leq 0,05$  (\*);  $P < 0,01$  (\*\*) y  $P < 0,001$  (\*\*\*)





Resultados



## 1. Obtención de ratones dobles KO de *Mct8Lat2* y sus características fenotípicas a la edad de P21 y Adultos.

Para determinar si el transportador *Lat2* en ratones es el responsable de la diferencia de fenotipo entre animales KO de *Mct8* y pacientes con el síndrome de Allan-Herndon-Dudley (AHD) hemos obtenido ratones dobles KO de *Mct8Lat2*.

Para ello hemos contado con ratones KO de *Lat2* con fondo genético mixto C57/129Ola cedidos por los Drs. Manuel Palacín de la Universidad de Barcelona y Virginia Nunes (IDIBELL) y ratones KO de *Mct8* con fondo genético C57Bl/6J:129Sv generados por A. Dumitrescu en la Universidad de Chicago. Los cruces realizados para conseguir los dobles KO se indican en el apartado 1.3 de materiales y metodos.

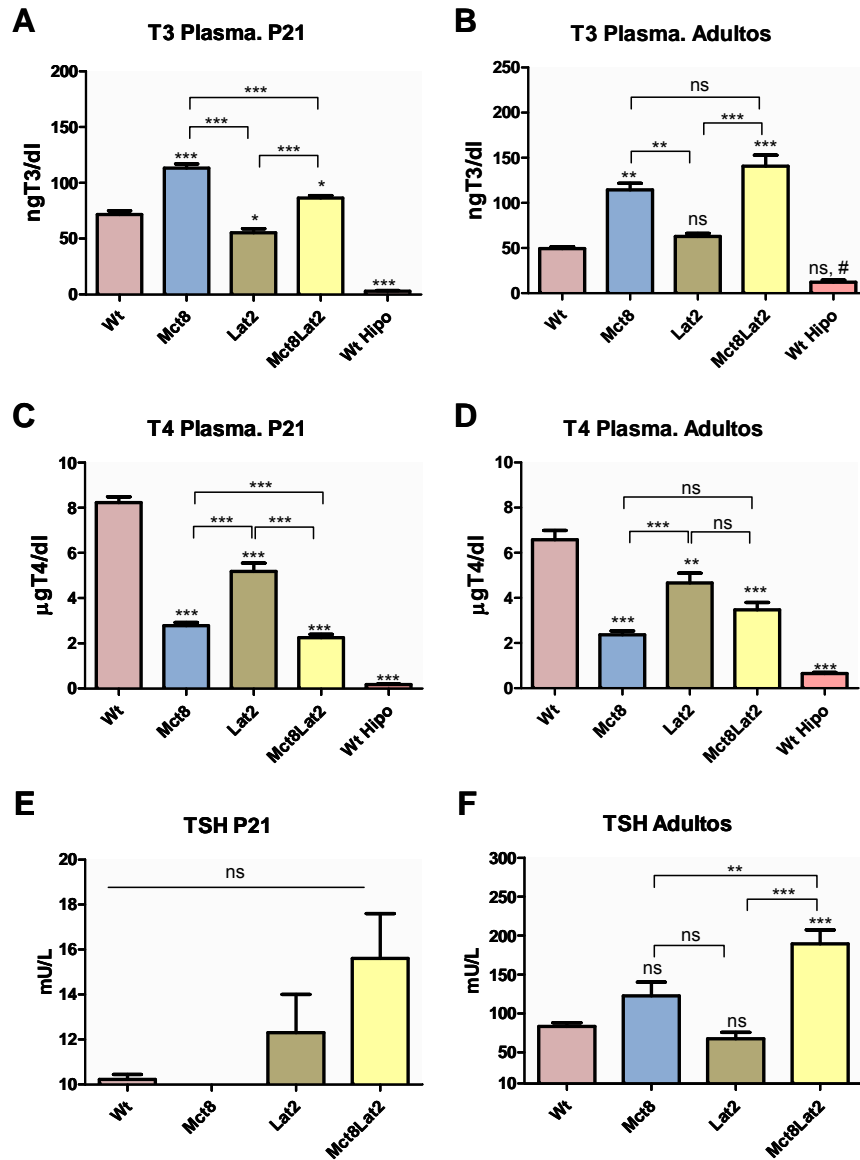
Una vez obtenidos los ratones dobles KO analizamos su fenotipo a la edad posnatal P21 y en adultos. La enfermedad AHD muestra alteraciones endocrinas características, con unos niveles de T3 elevados, T4 y rT3 disminuidos y TSH normal o ligeramente incrementada. Además presenta síntomas neurológicos graves provocando retraso psicomotor. Hemos analizado tanto las características endocrinas como las neurológicas en los animales dobles KO de *Mct8Lat2*.

### 1.1 Alteraciones endocrinas

Para comprobar si los ratones KO de *Mct8Lat2* presentan las mismas características endocrinas que los animales KO de *Mct8* y que los pacientes con el síndrome AHD, así como para estudiar la aportación del transportador *Lat2* al transporte y metabolismo de las HT, medimos las concentraciones de T3, T4 y TSH en plasma a la edad de desarrollo posnatal de 21 días (P21) y en adultos (Fig. 7).

La deficiencia de *Mct8* produjo los cambios esperados en los niveles de HT, con un incremento de T3 del 58% a P21 y un incremento del 132% en los adultos. La T4, en cambio, disminuyó en un 65% en ambas edades. Los animales KO de *Lat2* presentaron una disminución de T3 y T4 a la edad de P21 de un 23 y 37% respectivamente en comparación con los animales Wt, mientras que los adultos mostraron una disminución del 30% en los niveles de T4 con respecto a los Wt manteniendo una T3 normal. En los animales dobles KO de *Mct8Lat2* predomina el efecto de la inactivación de *Mct8*, con un incremento del

20% en la T3 a P21 y cerca del 200% en los adultos. La T4 a P21 disminuyó en un 73% y en un 48% en los adultos. En ningún caso las alteraciones en los niveles hormonales llegaron a ser como en los animales Wt hipotiroides, donde los niveles eran prácticamente nulos.

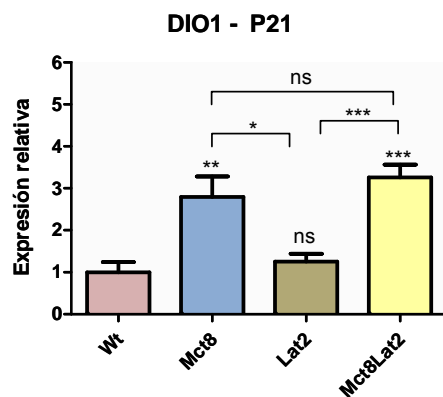


**Figura 7. Evaluación de las características endocrinas de animales P21 y adultos Wt, Wt hipotiroides, KO de *Mct8*, KO de *Lat2* y dobles KO de *Mct8Lat2*.** Las figuras representan las determinaciones de T3 (A,B), T4 (C,D) y TSH (E,F) en plasma obtenidas mediante RIA, expresadas en ng/dl, μg/dl y mU/l respectivamente. Posteriormente fueron analizadas con el análisis estadístico ANOVA de una vía y el posterior test de Tukey. \*: P<0,05; \*\*: P<0,01; \*\*\*: P<0,001; ns: no significativo; #:P<0,001 en un análisis t-test del grupo con respecto al grupo Wt. La significatividad estadística de cada grupo en relación con los animales Wt se representa sobre la barra correspondiente al grupo.

A P21 tanto en animales Wt como en animales KO de *Mct8* la TSH se encontraba por debajo del límite de detección del método. En los animales KO de *Lat2* y KO de *Mct8Lat2* la mitad de los animales se encontraban por debajo del límite de detección y el resto presentaban gran dispersión en los datos de manera que no hay diferencias significativas entre grupos. En los animales adultos sólo los KO de *Mct8Lat2* muestran diferencias significativas con respecto a los Wt con un incremento de TSH del 127%.

En resumen, mientras que los animales KO de *Lat2* presentan una ligera hipotiroxinemia, los animales dobles KO de *Mct8Lat2* son más parecidos a los animales KO simples de *Mct8*. Ambos presentan las alteraciones hormonales observadas en los pacientes con el síndrome de AHD.

Los cambios en las concentraciones circulantes de T3 a P21 se correlacionan con la expresión del gen dependiente de T3 *Desyodasa tipo 1 (Dio1)* en hígado (Fig. 8). La expresión de *Dio1* se encuentra incrementada tanto en animales KO de *Mct8* como en los dobles KO de acuerdo con el aumento de T3 en plasma en estos animales. En cambio, no existe ningún efecto en la expresión de *Dio1* en los animales KO de *Lat2*.

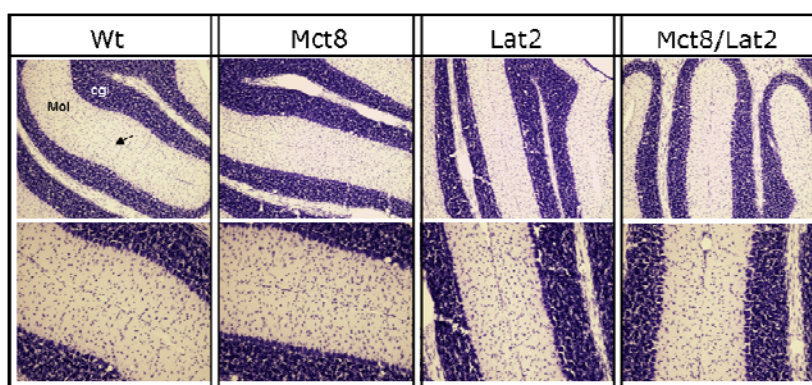


**Figura 8. Expresión del gen dependiente de T3 *Dio1* en hígado de ratones P21 Wt, KO de *Mct8*, KO de *Lat2* y dobles KO de *Mct8Lat2*.** La figura muestra los niveles relativos de ARNm de *Dio1* medidos mediante PCR en tiempo real. Los datos se analizaron con el análisis estadístico ANOVA de una vía y el posterior test de Tukey. \*:  $P < 0,05$ ; \*\*:  $P < 0,01$ ; \*\*\*:  $P < 0,001$ ; ns: no significativo. La significatividad estadística de cada grupo en relación con los animales Wt se representa sobre la barra correspondiente al grupo.

## 1.2 Alteraciones neurológicas

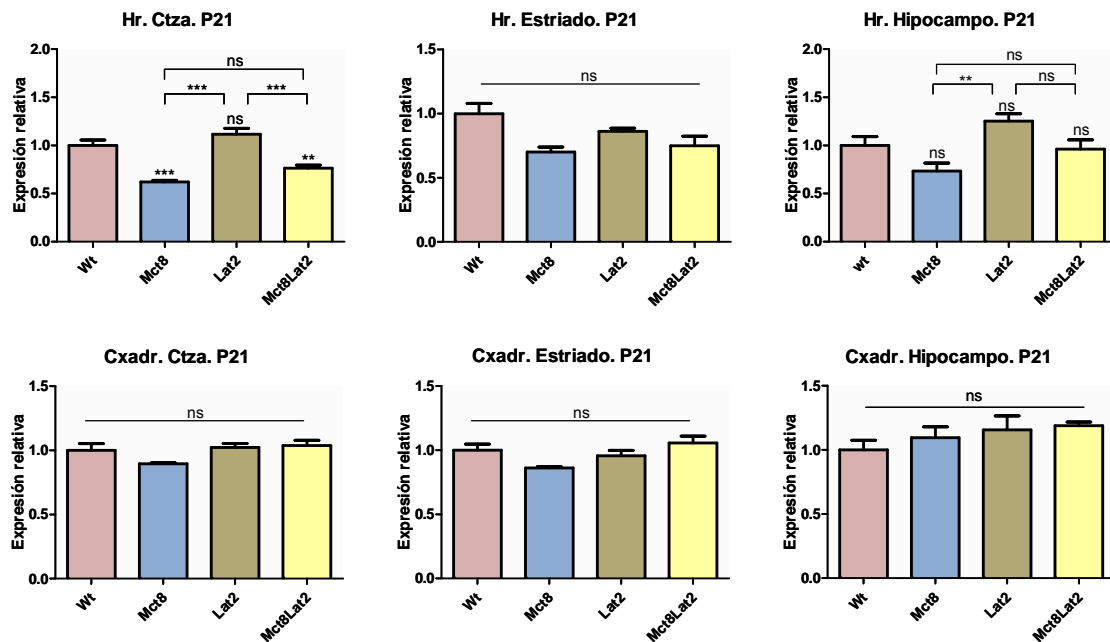
La enfermedad AHD presenta síntomas neurológicos graves. Se piensa que estos problemas se deben a la falta de transporte de HT al cerebro durante el desarrollo causados por un *Mct8* no funcional. Para evaluar el fenotipo neurológico de los ratones dobles KO de *Mct8Lat2* buscamos signos de hipotiroidismo cerebral y realizamos el *rotarod* como prueba de comportamiento.

El desarrollo de la estructura del cerebelo en roedores es un proceso altamente dependiente de HT. El hipotiroidismo provoca un retraso en la migración de la cge (Fig.4 de la introducción). Para determinar si los ratones dobles KO de *Mct8Lat2* presentan alteraciones en la estructura del cerebelo realizamos una tinción de Nissl a P21 en los distintos genotipos. Como puede apreciarse en la figura 9 no existen diferencias entre los grupos; todos presentan una migración prácticamente completa. Por tanto, los ratones dobles KO, al igual que los ratones KO de *Mct8*, parecen tener un aporte de HT normal al cerebelo.



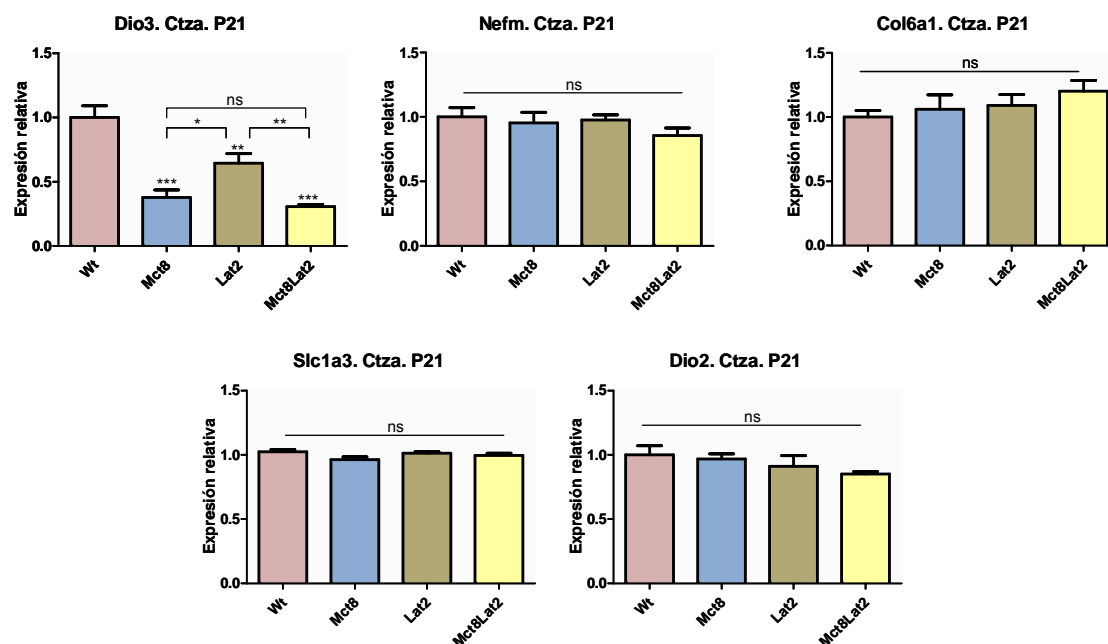
**Figura 9. Nissl de cerebelo de ratones Wt, KO de *Mct8*, KO de *Lat2* y dobles KO de *Mct8Lat2* a la edad de P21.** La figura muestra cortes sagitales de cerebelo tras una tinción de Nissl. No se observa retraso en la migración de la capa germinal externa en ninguno de los genotipos. Mol: capa molecular; cgi: capa granular interna; flecha: capa granular externa.

Otra manera de determinar el fenotipo hipotiroideo de estos animales y de analizar el efecto que produce la deficiencia de *Lat2* sobre los ratones KO de *Mct8* en la acción de la T3 en el cerebro es analizar la expresión de genes dependientes de T3. Mediante qPCR medimos la expresión de varios genes dependientes de T3 en corteza, estriado e hipocampo a la edad de P21 (Fig.10). *Hairless (Hr)*, gen altamente sensible a las concentraciones de T3, sólo en la corteza mostró diferencias significativas entre los distintos genotipos comparados con los Wt. Mientras que los animales KO de *Lat2* tienen una expresión similar a los animales Wt, los ratones KO de *Mct8* y KO de *Mct8Lat2* mostraron una disminución de la expresión de un 40%. Sin embargo, el gen *Cxadr*, también dependiente de T3, presentó una expresión completamente normal en las tres regiones analizadas en todos los grupos.



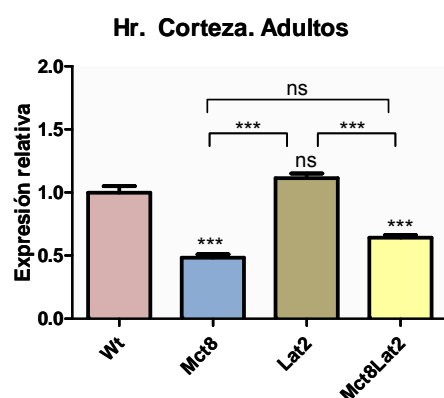
**Figura 10. Expresión de genes dependientes de T3 en ratones Wt, KO de *Mct8*, KO de *Lat2* y dobles KO de *Mct8Lat2* a P21.** Las figuras representan los niveles relativos de ARNm de *Hr* y *Cxadr* en la corteza cerebral, estriado e hipocampo obtenidos mediante PCR en tiempo real. Los datos se analizaron con el análisis estadístico ANOVA de una vía y el posterior test de Tukey. \*\*:  $P < 0,01$ ; \*\*\*:  $P < 0,001$ ; ns: no significativo. La significatividad estadística de cada grupo en relación con los animales Wt se representa sobre la barra correspondiente al grupo.

Con el fin de analizar una batería más amplia de genes, medimos la expresión de *Dio3*, *Nefm*, *Col6a1*, *Slc1a3* y *Dio2*. En la figura 11 se muestra la expresión de dichos genes en la corteza cerebral a P21. Todos estos genes presentaban una expresión normal excepto la *Dio3*, la cual mostró una disminución de la expresión de un 63 y 70% en los ratones KO de *Mct8* y *Mct8Lat2* respectivamente, y una reducción del 36% en los animales KO de *Lat2*. En estriado e hipocampo no había diferencias entre los diferentes genotipos (datos no mostrados).



**Figura 11. Expresión de genes dependientes de T3 en ratones Wt, KO de *Mct8*, KO de *Lat2* y dobles KO de *Mct8Lat2* en corteza a P21.** Las figuras representan los niveles relativos de ARNm de 5 genes regulados por T3 en la corteza cerebral obtenidos mediante PCR en tiempo real. Los datos se analizaron con el análisis estadístico ANOVA de una vía y el posterior test de Tukey. \*:  $P < 0,05$ ; \*\*:  $P < 0,01$ ; \*\*\*:  $P < 0,001$ ; ns: no significativo. La significatividad estadística de cada grupo en relación con los animales Wt se representa sobre la barra correspondiente al grupo.

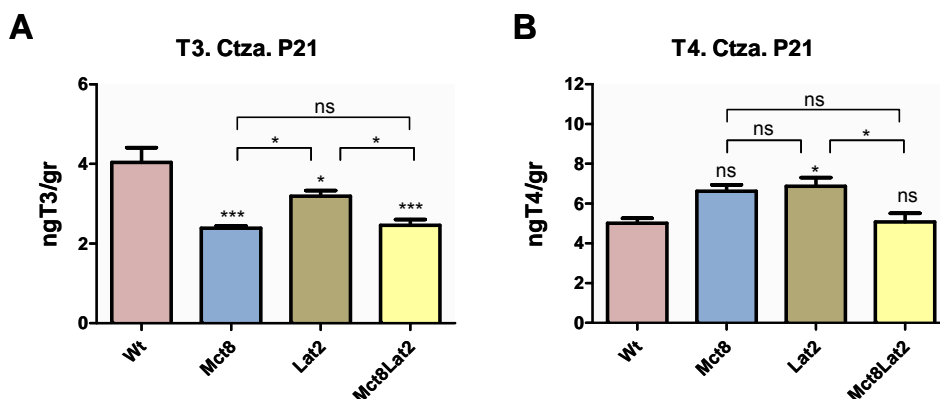
En la edad adulta estos patrones de expresión se mantienen. En la figura 12 se muestra la expresión de *Hr* en la corteza de animales adultos. Igual que ocurre a P21, los ratones KO de *Lat2* no muestran diferencias con respecto a los Wt, mientras que los KO de *Mct8* y los dobles KO disminuyen la expresión en un 52 y un 36% respectivamente.



**Figura 12. Expresión del gen *Hairless* (*Hr*) en animales Wt, KO de *Mct8*, KO de *Lat2* y dobles KO de *Mct8Lat2* en corteza de adultos.** En la figura se representan los niveles relativos de ARNm del gen regulado positivamente por T3 *Hr* en la corteza cerebral de animales adultos obtenidos mediante PCR en tiempo real. Los datos se analizaron mediante el análisis estadístico ANOVA de una vía y el posterior test de Tukey. \*\*\*:  $P < 0,001$ ; ns: no significativo. La significatividad estadística de cada grupo en relación con los animales Wt se representa sobre la barra correspondiente al grupo.



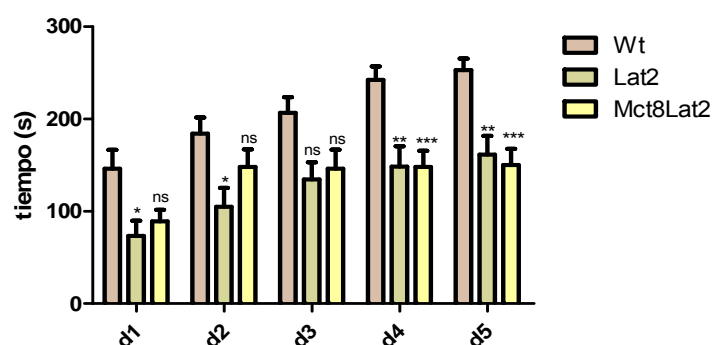
Para intentar correlacionar los niveles de expresión génica con las concentraciones de HT, realizamos un radioinmunoensayo (RIA) con las cortezas de animales P21 para determinar los niveles de T3 y T4 (Fig.13).



**Figura 13. Evaluación de las concentraciones de hormonas tiroideas en la corteza de animales P21 Wt, KO de *Mct8*, KO de *Lat2* y dobles KO de *Mct8Lat2*.** Las figuras representan las determinaciones de T3 (A) y T4 (B) en corteza cerebral obtenidas mediante RIA y expresadas en ng/gr. Los datos se analizaron con el análisis estadístico ANOVA de una vía y el posterior test de Tukey. \*:  $P < 0,05$ ; \*\*\*:  $P < 0,001$ ; ns: no significativo. La significatividad estadística de cada grupo en relación con los animales Wt se representa sobre la barra correspondiente al grupo.

De acuerdo con los niveles de expresión génica, las concentraciones de T3 se encontraban disminuidas en un 40% en animales KO de *Mct8* y *Mct8Lat2* con respecto a los Wt y en un 20% en animales deficientes de *Lat2*. Las concentraciones de T4 sólo fueron significativas en los ratones KO de *Lat2* con un incremento de T4 del 37% en estos animales. Los datos parecen indicar que el transportador *Lat2* tiene cierta relevancia en el transporte de HT en la corteza cerebral.

La prueba de comportamiento del Rotarod nos permite evaluar la resistencia y la coordinación motora de los animales objeto de estudio. Realizamos la prueba en animales adultos comparando los Wt con los animales KO de *Lat2* y los dobles KO de *Mct8Lat2* con el fin de determinar si la deficiencia del transportador *Lat2* en estos últimos animales provocaba un cuadro neurológico no observado en los animales KO de *Mct8* (Fig. 14). Los resultados mostraron una peor coordinación de los ratones deficientes de *Lat2* en comparación con los Wt, que no se veía empeorada en los animales dobles KO.

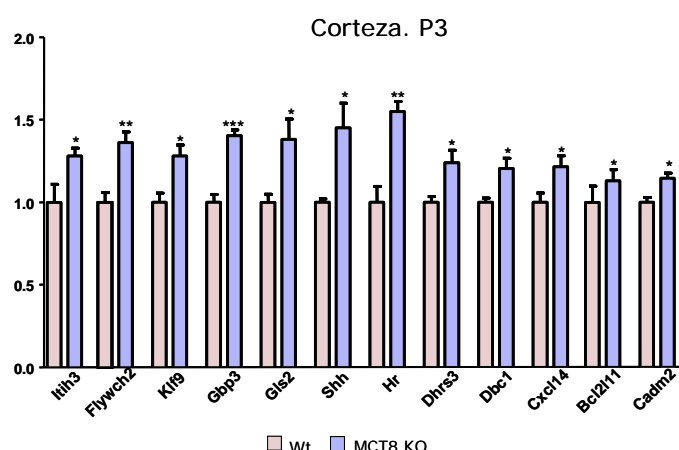


**Figura 14. Prueba de comportamiento: Rotarod.** La figura muestra el resultado del test del rotarod en animales Wt, KO de *Lat2* y dobles KO de *Mct8Lat2* adultos. Los datos se analizaron con el análisis estadístico ANOVA de dos vías y el posterior test de Bonferroni. \*:  $P < 0,05$ ; \*\*:  $P < 0,01$ ; \*\*\*:  $P < 0,001$ ; ns: no significativo. La significatividad estadística de cada grupo en relación con los animales Wt se representa sobre la barra correspondiente al grupo.

El conjunto de datos de expresión génica y concentraciones de HT indica que los ratones dobles KO de *Mct8Lat2* son similares a los ratones KO simples de *Mct8*. Al igual que los ratones con la delección de *Mct8*, los dobles KO reproducen las características endocrinas típicas del síndrome AHD, con unos niveles elevados de T3 y disminuidos de T4 en plasma. Sin embargo, no reproducen un fenotipo hipotiroideo en sus niveles de expresión génica ni en la estructura del cerebelo. En la prueba de comportamiento se observa que la deficiencia de *Lat2* provoca que los ratones KO de *Lat2* y los dobles KO presenten alteraciones neurológicas no descritas en los animales deficientes de *Mct8*, aunque en ningún caso son tan graves como los síntomas neurológicos encontrados en los pacientes. El transportador *Lat2* no parece ser el responsable de la compensación que se produce en el transporte de HT en el cerebro cuando *Mct8* no es funcional.

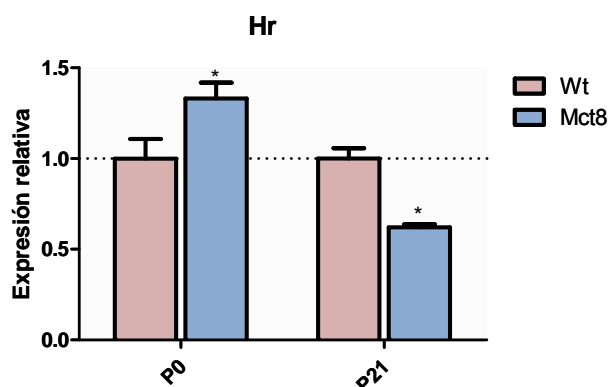
## 2. Los animales KO de *Mct8* presentan un estado de “hipertiroidismo cerebral” en edades posnatales tempranas

Recientemente hemos observado tanto en nuestro laboratorio como en el laboratorio del Dr. Refetoff de la Universidad de Chicago, que los animales deficientes de *Mct8* presentan signos de “hipertiroidismo” en la corteza cerebral durante el periodo perinatal. Como podemos observar en la figura 15, 12 genes regulados positivamente por T3 presentan una expresión incrementada en los animales KO de *Mct8* con respecto a los Wt a la edad de P3, lo que podría indicar que, a esta edad, la corteza cerebral tendría un mayor aporte de T3 en los animales deficientes de *Mct8*.



**Figura 15. Efecto de la delección de *Mct8* sobre los niveles de expresión génica en corteza a la edad de P3.** En la figura se representan los niveles relativos de ARNm de 12 genes regulados positivamente por T3 en la corteza cerebral de animales Wt y KO de *Mct8* a P3. Los resultados se expresan como valor relativo con respecto al valor de 1 asignado a los animales Wt. Los datos se analizaron con el análisis estadístico t-test. \*:  $P < 0,05$ ; \*\*:  $P < 0,01$ ; \*\*\*:  $P < 0,001$ .

En otro experimento confirmamos que a la edad de P0 (día del nacimiento) los ratones KO de *Mct8* también presentaban una expresión aumentada del gen dependiente de T3 *Hairless*. En la figura 16 se observa la comparación de la expresión de *Hr* a la edad de P0 y P21 en animales Wt y KO de *Mct8*. Mientras que a la edad de P21 se observa una disminución del 40% en la expresión de *Hr* en los ratones KO de *Mct8* indicando un ligero hipotiroidismo, a la edad de P0 existe un incremento del 30%, indicando un posible “hipertiroidismo” en la corteza cerebral de estos animales ( $P < 0,05$ ).



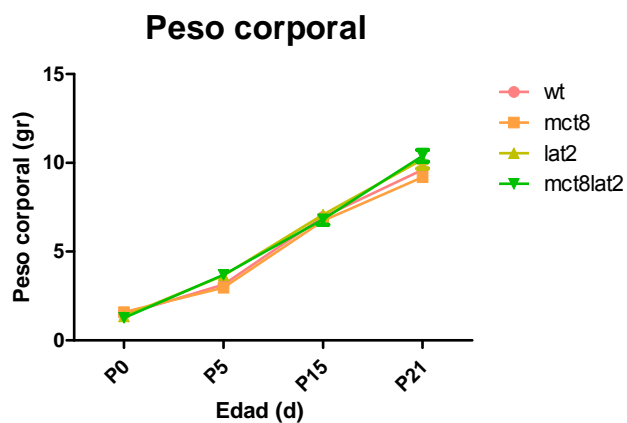
**Figura 16. Comparación de la distinta expresión de *Hr* en función de la edad en animales Wt y KO de *Mct8*.** La figura muestra la expresión de *Hr* como ejemplo de gen regulado por T3 a la edad de P0 y P21 en corteza cerebral de animales Wt y KO de *Mct8*. Se realizó un ANOVA de dos vías y el posterior test de Bonferroni como análisis estadístico. \*:  $P < 0,05$ .

### 3. Estudio de la expresión génica a lo largo del desarrollo en animales

#### KO de *Mct8Lat2*

En base a los resultados obtenidos en los estudios previos de edades posnatales tempranas en los animales KO de *Mct8*, decidimos estudiar la interacción entre el *Mct8* y el *Lat2* a lo largo del desarrollo desde la edad embrionaria E17 hasta la edad posnatal P21. Para la obtención de los 4 genotipos diferentes de animales se han utilizado madres *Mct8*<sup>-/-</sup>*Lat2*<sup>+/+</sup> y *Mct8*<sup>-/-</sup>*Lat2*<sup>-/-</sup>. Ambas son portadoras de *Mct8* y sólo difieren en si son o no KO de *Lat2*. Puesto que esta diferencia podría afectar al aporte de HT a los fetos y por tanto, a los resultados obtenidos de animales en edades tempranas, decidimos realizar el análisis estadístico llamado Modelo Lineal General (MLG o MANOVA). Este análisis nos permite tener en cuenta la posible interacción de las madres y nos permite hacer comparaciones entre todos los grupos.

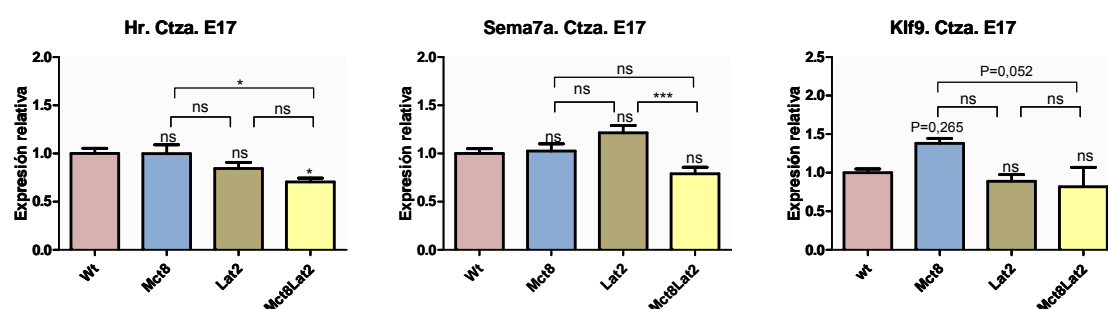
En general, existen pocas diferencias en el peso corporal de los animales deficientes de *Mct8*, de *Lat2* o de ambos transportadores en edades posnatales tempranas (Fig.17).



**Figura 17. Evaluación del peso corporal de animales deficientes de *Mct8*, de *Lat2* o de ambos transportadores durante el desarrollo posnatal.** La figura muestra las diferencias de peso observadas entre animales Wt, KO de *Mct8*, KO de *Lat2* y KO de *Mct8Lat2* tomadas a P0, P5, P15 y P21.

Para este estudio obtuvimos muestras de corteza cerebral de animales Wt, KO de *Mct8*, KO de *Lat2* y dobles KO en las que medimos la expresión de genes dependientes de T3 a distintas edades entre E17 y P21.

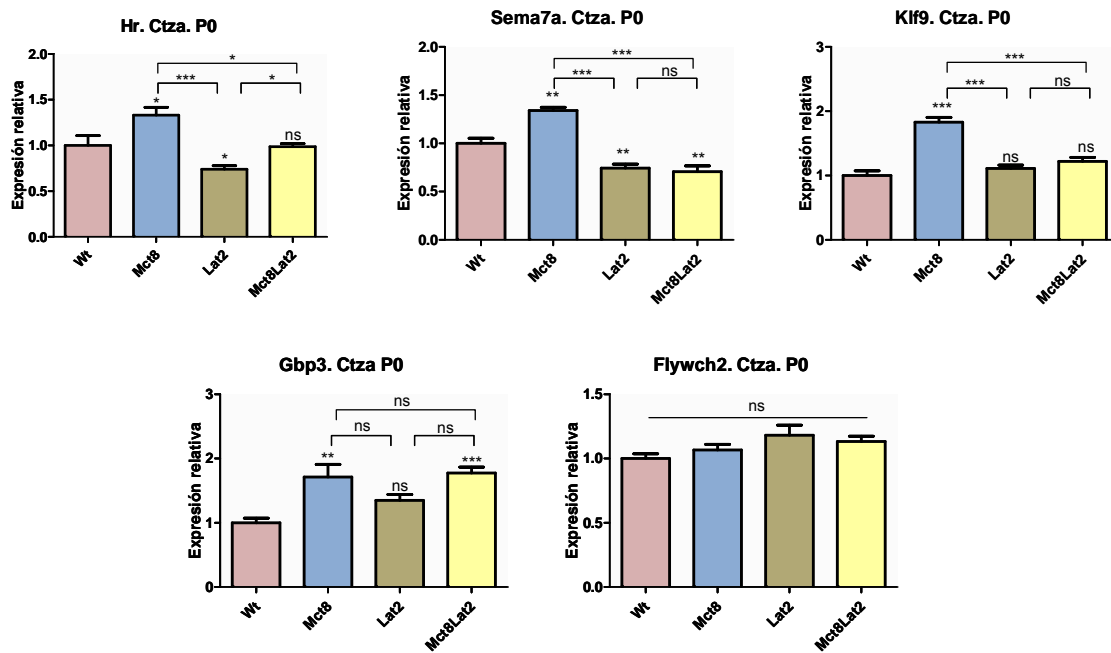
A la edad de E17 los animales KO de *Mct8* todavía no presentaban signos de “hipertiroidismo”. Estos animales mostraban unos niveles de expresión normal de los genes *Hr*, *Sema7a* y *Klf9* (Fig.18). Sin embargo, realizando un análisis estadístico *unpaired t-test* entre Wt y KO de *Mct8*, el gen *Klf9* presentaba un aumento significativo de la expresión ( $P=0,001$ ), indicando ya una posible tendencia hacia el “hipertiroidismo”. Tanto los animales KO de *Lat2* como los dobles KO mantenían unos niveles de expresión génica similares a los animales Wt. Tan sólo los animales KO de *Mct8Lat2* mostraban un ligero hipotiroidismo en la expresión del gen *Hr*, manteniéndose normal en los genes *Sema7a* y *Klf9*.



**Figura 18. Expresión de genes dependientes de T3 en animales Wt, KO de *Mct8*, KO de *Lat2* y dobles KO de *Mct8Lat2* en corteza a la edad embrionaria E17.** Las figuras representan los niveles relativos de ARNm de 3 genes regulados por T3 en la corteza cerebral obtenidos mediante PCR en tiempo real. Los datos se analizaron con el análisis estadístico MLG y el posterior test de Tukey. \*:  $P<0,05$ ; \*\*\*:  $P<0,001$ ; ns: no significativo; P: valor de P en el análisis MLG. La significatividad estadística de cada grupo en relación con los animales Wt se representa sobre la barra correspondiente al grupo.

Los genes analizados a la edad de P0 fueron *Hr*, *Sema7a*, *Klf9*, *Gbp3* y *Flywch2* (Fig. 19). La expresión de los 3 primeros genes en animales deficientes de *Mct8* presentaba un aumento significativo de entre el 35% (*Hr*, *Sema7a*) y el 80% (*Klf9*), indicando de nuevo, un posible “hipertiroidismo” en la corteza de estos animales. Estos datos, por tanto, confirman los estudios previos realizados a esta edad. En cambio, los animales con la delección de *Lat2* mostraban unos niveles normales (*Klf9*) o ligeramente disminuidos (*Hr*, *Sema7a*) de expresión indicando un suave hipotiroidismo cerebral. Los ratones KO de *Mct8Lat2* presentaban niveles normales de expresión de los genes *Hr* y *Klf9* y disminuidos significativamente en el gen *Sema7a* siendo similar, en este caso, a los animales KO de *Lat2*. Es decir, los animales dobles KO muestran una expresión génica normalizada, con valores similares a los Wt o ligeramente disminuidos. La delección de *Lat2* consigue revertir el

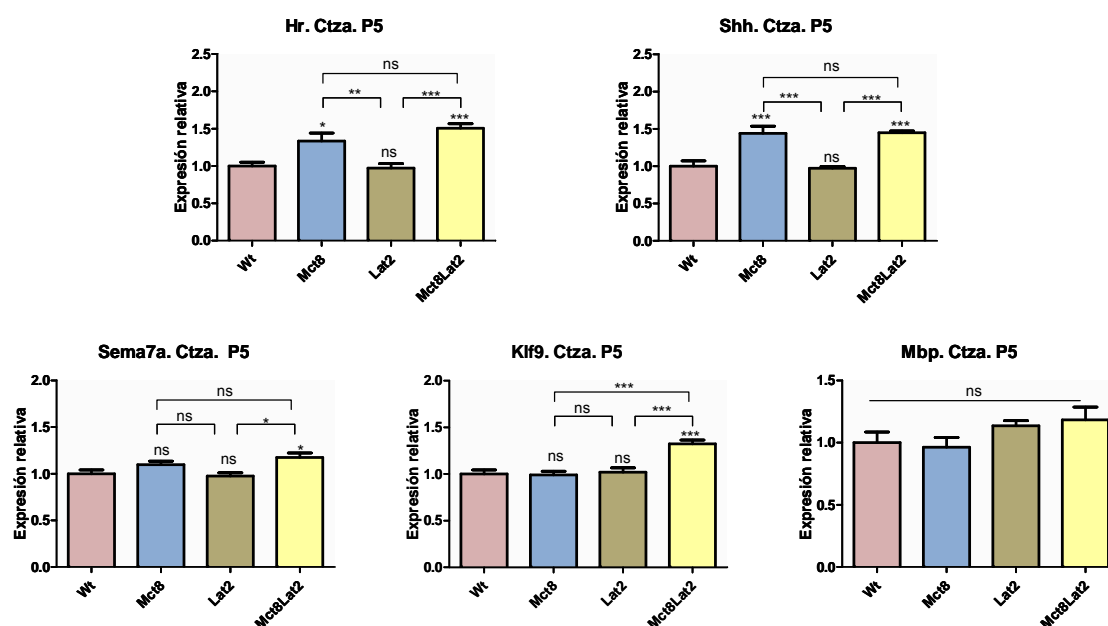
efecto producido por la falta de *Mct8* en los animales dobles KO. Sin embargo, este patrón de expresión no se mantiene en todos los genes analizados. La expresión del gen *Gbp3* mostraba un aumento significativo en animales KO de *Mct8*, efecto que no se revertía en los animales dobles KO de *Mct8Lat2* a pesar de que los animales con la única delección de *Lat2* presentaban unos niveles de expresión normales comparados con el Wt. El gen *Flywch2* no mostraba diferencias significativas entre ninguno de los genotipos.



**Figura 19. Expresión de genes dependientes de T3 en ratones Wt, KO de *Mct8*, KO de *Lat2* y dobles KO de *Mct8Lat2* en corteza a P0.** Las figuras representan los niveles relativos de ARNm de 5 genes regulados por T3 en la corteza cerebral obtenidos mediante PCR en tiempo real. Los datos se analizaron con el análisis estadístico MLG y el posterior test de Tukey. \*:  $P < 0,05$ ; \*\*:  $P < 0,01$ ; \*\*\*:  $P < 0,001$ ; ns: no significativo. La significatividad estadística de cada grupo en relación con los animales Wt se representa sobre la barra correspondiente al grupo.

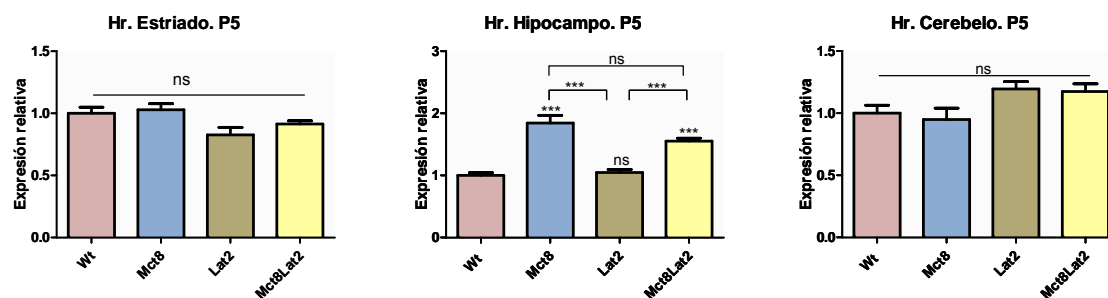
El análisis realizado a la edad de P5 muestra que los ratones con el transportador *Mct8* mutado continúan teniendo unos niveles de expresión elevados en un 40% de los genes dependientes de HT *Hr* y *Sbb* en comparación con los ratones silvestres (Fig.20). Curiosamente, a esta edad, al contrario de lo que ocurre a P0, los dobles KO no presentan unos niveles de expresión normalizados, siendo similares a los animales KO de *Mct8*. Es decir, la falta del transportador *Lat2* ya no es capaz de revertir el efecto de “hipertiroidismo” que produce la deficiencia de *Mct8*. Los ratones KO de *Lat2* mantienen los mismos niveles de expresión que los ratones silvestres. Sin embargo, los genes *Sema7a* y

*Klf9* aumentaron su expresión sólo en los animales dobles KO y el gen *Mbp* mantenía una expresión totalmente compensada en los 3 genotipos analizados, siendo todos similares a los animales Wt.



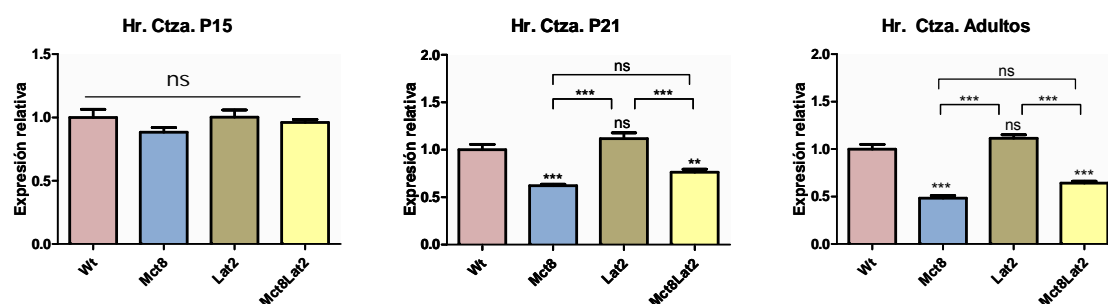
**Figura 20. Expresión de genes dependientes de T3 en la corteza de ratones Wt, KO de *Mct8*, KO de *Lat2* y dobles KO de *Mct8Lat2* a P5.** En la figura se muestran los niveles relativos de ARNm de 5 genes regulados por T3 en la corteza cerebral obtenidos mediante PCR en tiempo real. Los datos se analizaron con el análisis estadístico MLG y el posterior test de Tukey. \*:  $P < 0,05$ ; \*\*:  $P < 0,01$ ; \*\*\*:  $P < 0,001$ ; ns: no significativo. La significatividad estadística de cada grupo en relación con los animales Wt se representa sobre la barra correspondiente al grupo.

A esta edad quisimos comprobar si en las distintas regiones cerebrales la interacción entre *Mct8* y *Lat2* era similar a la observada en la corteza, o si por el contrario, la deficiencia de uno u otro transportador o la deficiencia combinada de ambos producía efectos distintos dependientes de la región. Con este fin, analizamos la expresión de *Hr* en estriado, hipocampo y cerebelo. En la figura 21 se puede apreciar que ni en el estriado ni en el cerebelo existen diferencias significativas entre los distintos grupos. Todos mantienen una expresión génica compensada. Sin embargo, el hipocampo muestra el mismo patrón observado en la corteza cerebral, los animales KO de *Mct8* y los dobles KO de *Mct8Lat2* tienen aumentada la expresión de *Hr* en relación con los Wt en un 84 y 55% respectivamente, mientras que los animales KO de *Lat2* mantienen unos niveles normales. Esto indicaría que en el hipocampo los animales KO de *Mct8* también tienen mayor aporte de HT que los Wt, y que, al igual que en la corteza, la delección del transportador *Lat2* en animales deficientes de *Mct8* no consigue normalizar la expresión génica.



**Figura 21. Expresión del gen dependiente de T3 *Hairless* en ratones Wt, KO de *Mct8*, KO de *Lat2* y dobles KO de *Mct8Lat2* a P5.** Las figuras representan los niveles relativos de ARNm de *Hr* en estriado, hipocampo y cerebelo obtenidos mediante PCR en tiempo real. Los datos se analizaron con el análisis estadístico MLG y el posterior test de Tukey. \*\*\*:  $P < 0,001$ ; ns: no significativo. La significatividad estadística de cada grupo en relación con los animales Wt se representa sobre la barra correspondiente al grupo.

La siguiente edad analizada fue P15. Tras una transición a esta edad donde no se aprecian alteraciones en la expresión de *Hr* en ninguno de los genotipos (Fig.22), a la edad de P21 se observa una reducción del 40% en la expresión de *Hr* en los KO de *Mct8*, efecto que se mantiene en los animales adultos. La expresión de *Hr* en los ratones KO de *Lat2* era similar a los Wt a P21 y en adultos, y la deficiencia combinada de *Mct8* y *Lat2* producía un patrón similar a los animales KO de *Mct8* en ambas edades.



**Figura 22. Expresión de *Hr* en animales Wt, KO de *Mct8*, KO de *Lat2* y dobles KO de *Mct8Lat2* a P15, P21 y adultos.** Las figuras muestran los niveles relativos de ARNm de *Hr* en la corteza cerebral obtenidos mediante PCR en tiempo real. Los datos se analizaron con el análisis estadístico ANOVA de una vía y el posterior test de Tukey. \*\*:  $P < 0,01$ ; \*\*\*:  $P < 0,001$ ; ns: no significativo. La significatividad estadística de cada grupo en relación con los animales Wt se representa sobre la barra correspondiente al grupo.

En resumen, paradójicamente hemos observado que, al contrario de lo esperado, los animales deficientes de *Mct8* presentan un estado de “hipertiroidismo” en la corteza cerebral entre el día de nacimiento P0 y P5, así como también en el hipocampo a la edad de P5. En cambio, los animales dobles KO presentan un estado de eutiroidismo similar a los



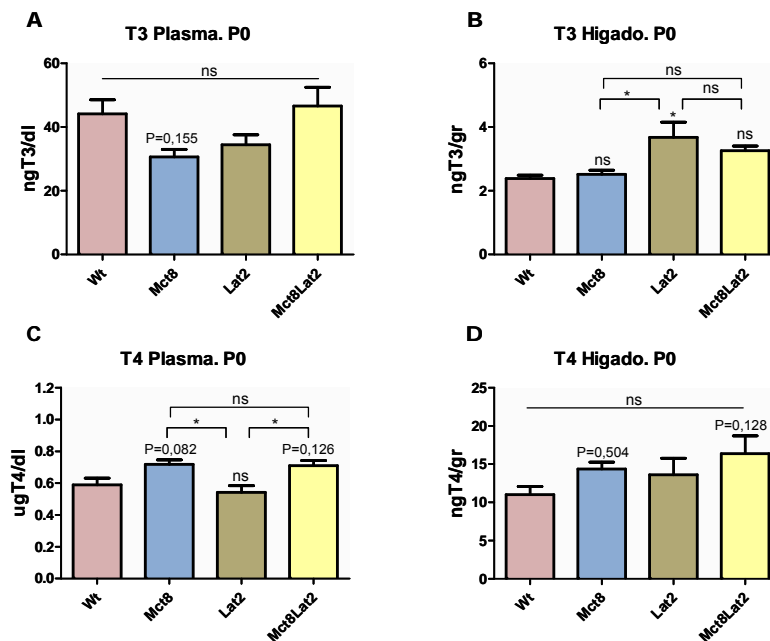
Wt a P0 que deja de observarse a la edad de P5, momento en el que estos animales presentan también un estado “hipertiroides” similar a los ratones KO de *Mct8*. Parece que el transportador Lat2 tiene un efecto transitorio sobre el transporte de HT durante el desarrollo temprano en un corto periodo de tiempo, que comienza a la edad de P0 y deja de tener efecto antes de P5. Durante este periodo la falta de Lat2 revierte el efecto “hipertiroides” producido por la deficiencia de Mct8 en animales dobles KO de *Mct8Lat2*. Posteriormente, a partir de P21 los animales KO de *Mct8* muestran el efecto esperado de un fallo de transporte de HT hacia el interior del cerebro; muestran un estado de hipotiroidismo total o parcialmente compensado en la corteza cerebral, efecto que predomina en los ratones deficientes de ambos transportadores.

#### **4. Determinación de las concentraciones de hormonas tiroideas y actividad Desyodasa tipo 2 en cerebro en edades tempranas del desarrollo.**

Para intentar correlacionar los efectos observados en los niveles de expresión génica producidos por los transportadores Mct8 y Lat2 a P0 y P5 medimos a estas edades las concentraciones de HT.

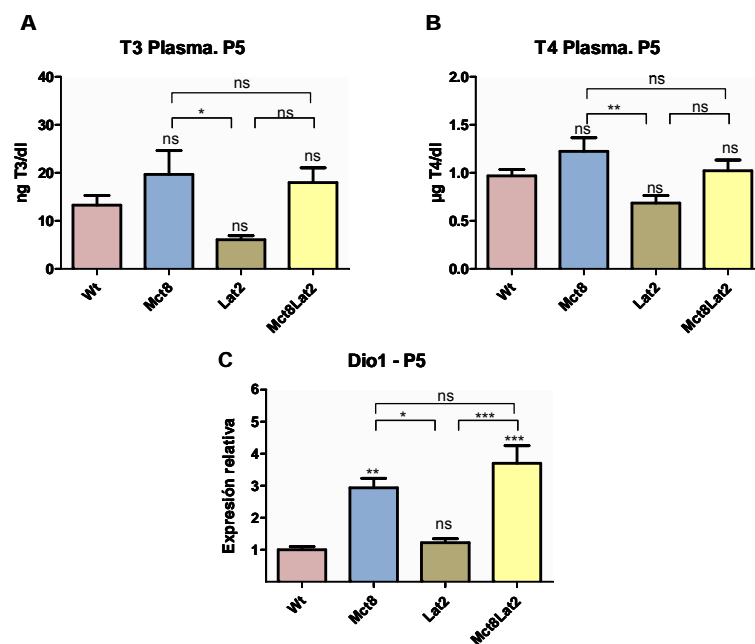
Primero, para conocer el estado hormonal periférico de estos animales llevamos a cabo radioinmunoensayos (RIA) de T3 y T4 en plasma. A P0 no existían diferencias significativas ni en los niveles de T3 ni en los niveles de T4 en plasma en ninguno de los grupos mediante el análisis estadístico MLG, aunque los animales KO de *Mct8* y *Mct8Lat2* presentaban un aumento del 20% en las determinaciones de T4 encontrándose en el límite de significatividad con unos valores de  $P=0,082$  y  $P=0,126$  respectivamente (Fig.23). Adicionalmente, para comprobar el rápido equilibrio que se produce entre el plasma y órganos como el hígado también determinamos los niveles de T3 y T4 en dicho tejido. No existían diferencias significativas de los distintos grupos en comparación con los animales Wt en las determinaciones de T3, a excepción de los animales KO de *Lat2*, que curiosamente, presentaron un aumento significativo del 53%. El análisis MLG no mostró diferencias significativas en las concentraciones de T4 en ninguno de los grupos, sin embargo los animales KO de *Mct8* y *Mct8Lat2* presentaban un incremento del 30 y 48% con unos valores de  $P=0,504$  y  $P=0,128$  respectivamente.

En el laboratorio del Dr. Refetoff en el que se realizaron en paralelo los estudios preliminares de la determinación del estado “hipertiroideo cerebral” de los animales KO de *Mct8* a P0 detectaron un aumento en las concentraciones de T4 en plasma e hígado de dichos animales. En este estudio sólo se analizó la diferencia entre animales Wt y KO de *Mct8* utilizando para ello un análisis estadístico *unpaired t-test*. Con el fin de comprobar si la discrepancia entre nuestros datos y los suyos era debida al análisis estadístico utilizado, llevamos a cabo *t-test* entre los animales Wt y los distintos grupos. Efectivamente, con este análisis también encontramos que el aumento de T4 en plasma e hígado en los animales KO de *Mct8* y en los dobles KO de *Mct8Lat2* era significativo con  $P < 0,05$ . Podemos concluir por tanto, que existe una tendencia a sufrir hipertiroidismo en los animales deficientes de *Mct8* a la edad de P0. Esta tendencia se mantiene a pesar de la falta adicional de *Lat2* en los animales dobles KO. Los resultados del *t-test* también resultaron significativos en los niveles de T3 en plasma de los animales KO de *Mct8*, pero este dato no era reproducible en el hígado.



**Figura 23. Evaluación de las concentraciones de T3 y T4 en plasma e hígado de animales Wt, KO de *Mct8*, KO de *Lat2* y dobles KO de *Mct8Lat2* a P0.** Las figuras representan las determinaciones de T3 (A,B) y T4 (C,D) en plasma e hígado obtenidas mediante RIA, expresadas en ngT3/dl, ugT4/dl en plasma y ngT3-T4/gr en hígado. Los datos fueron analizados con el análisis estadístico MLG y el posterior test de Tukey. \*:  $P < 0,05$ ; ns: no significativo; P: valor de P en el análisis MLG. La significatividad estadística de cada grupo en relación con los animales Wt se representa sobre la barra correspondiente al grupo. Los animales KO de *Mct8* y *Mct8Lat2* presentan un aumento del 20% en las concentraciones de T4 en plasma y del 30-48% en hígado respectivamente no llegando a ser significativo con este análisis. Sin embargo, comparaciones entre Wt y *Mct8* o Wt y *Mct8Lat2* mediante *t-test* resultaban significativas con  $P < 0,05$  indicando una tendencia a presentar la T4 incrementada.

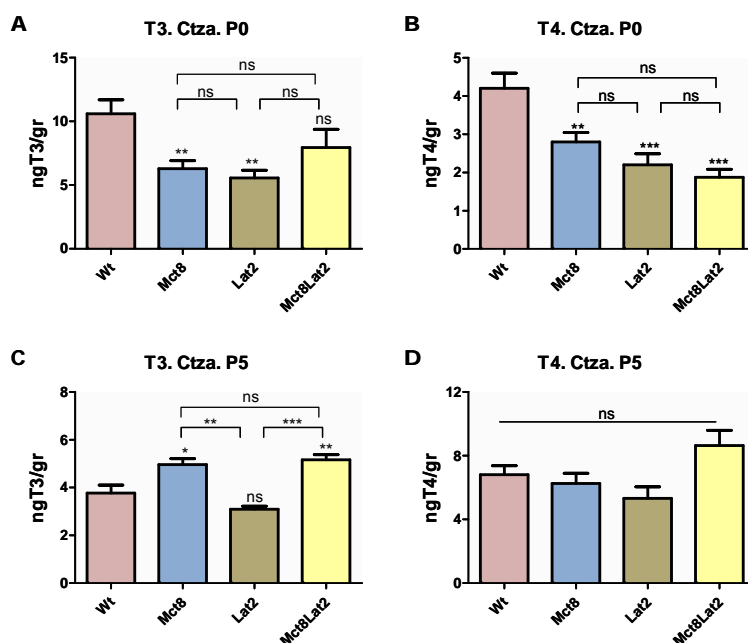
A la edad de P5 las concentraciones de T3 y T4 en plasma presentaban unos valores similares a los animales silvestres en todos los grupos analizados (Fig.24). Sin embargo, en la determinación de T3 los valores se encontraban cercanos al límite de detección de la técnica y existía gran variabilidad entre ellos. Puesto que no fue posible repetir este experimento analizamos la expresión del gen diana de T3 *Dio1* (*Desyodasa tipo 1*) en hígado (Fig.24C). Este gen es muy sensible al aumento de las concentraciones de T3 plasmáticas. *Dio1* presentaba una expresión incrementada en un 200% en animales KO de *Mct8* y un 270% en los dobles KO, indicando que estos animales ya mostraban un posible aumento de T3 en plasma típico del síndrome de AHD.



**Figura 24. Determinación del estado tiroideo de animales Wt, KO de *Mct8*, KO de *Lat2* y dobles KO de *Mct8Lat2* a P5.** A, B: Concentraciones de T3 y T4 en plasma obtenidas mediante RIA y expresadas en ng/dl y µg/dl respectivamente. C: Expresión relativa del gen dependiente de T3 *Dio1* en hígado. Los datos fueron analizados con el análisis estadístico MLG y el posterior test de Tukey. \*: P<0,05; \*\*: P<0,01; \*\*\*: P<0,001; ns: no significativo. La significatividad estadística de cada grupo en relación con los animales Wt se representa sobre la barra correspondiente al grupo.

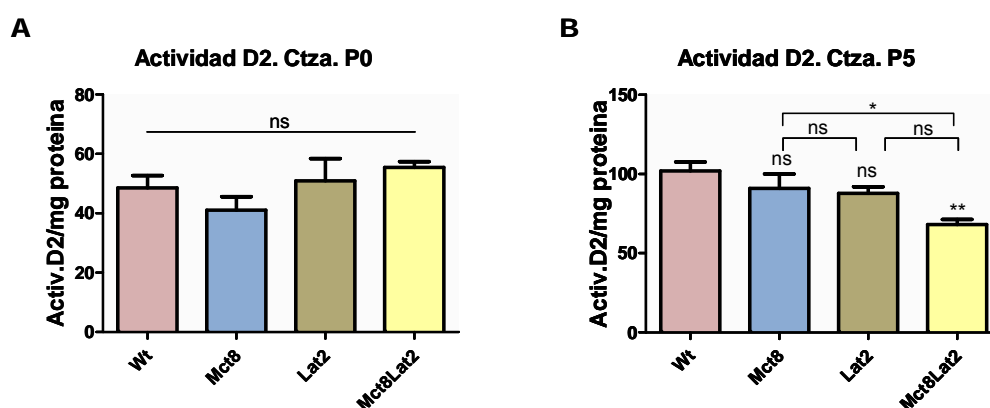
Tras haber determinado el estado periférico de estos animales, quisimos comprobar si existía una correlación entre los niveles de expresión génica y las concentraciones de HT en la corteza de los distintos grupos a P0 y P5. Si bien, a la edad de P5 tanto los animales KO de *Mct8* como los dobles KO presentaban un incremento de la concentración de T3 (Fig.25) del 25 y 35% respectivamente, estando de acuerdo con el 31 y 37% de incremento en la

expresión de *Hr* (Fig.20), a la edad de P0 no existía una correlación entre los niveles de expresión observados y las concentraciones de T3. A P0 los ratones KO de *Mct8* y KO de *Lat2* mostraron una reducción de T3 del 40 y 50% respectivamente, mientras que la disminución del 25% ocurrida en los animales KO de *Mct8Lat2* no resultó significativa. A esta edad las concentraciones de T4 también se encontraban disminuidas un 34% en los KO de *Mct8*, un 48% en los KO de *Lat2* y un 56% en los dobles KO. A P5, en cambio, las concentraciones de T4 no mostraban alteraciones en comparación con los Wt.



**Figura 25. Evaluación de las concentraciones de hormonas tiroideas en la corteza de animales P0 y P5 Wt, KO de *Mct8*, KO de *Lat2* y dobles KO de *Mct8Lat2*.** Las figuras representan las determinaciones de T3 y T4 en corteza cerebral a P0 (A, B) y a P5 (C, D) obtenidas mediante RIA y expresadas en ng/gr. Los datos se analizaron con el análisis estadístico MLG y el posterior test de Tukey. \*:  $P < 0,05$ ; \*\*:  $P < 0,01$ ; \*\*\*:  $P < 0,001$ ; ns: no significativo. La significatividad estadística de cada grupo en relación con los animales Wt se representa sobre la barra correspondiente al grupo.

Puesto que la Desyodasa tipo 2 (D2) está implicada en la producción local de T3 en el cerebro, analizamos su actividad a P0 y P5 para comprobar si tenía relación con las concentraciones hormonales encontradas en la corteza. La D2 aumenta su actividad en situaciones de hipotiroidismo compensando la falta de T3 produciéndola a partir de la T4. No encontramos diferencias significativas entre los grupos a P0, y en el caso de P5, sólo los KO de *Mct8Lat2* mostraron una disminución de la actividad significativa ( $P < 0,01$ ) en comparación con los animales Wt (Fig. 26).



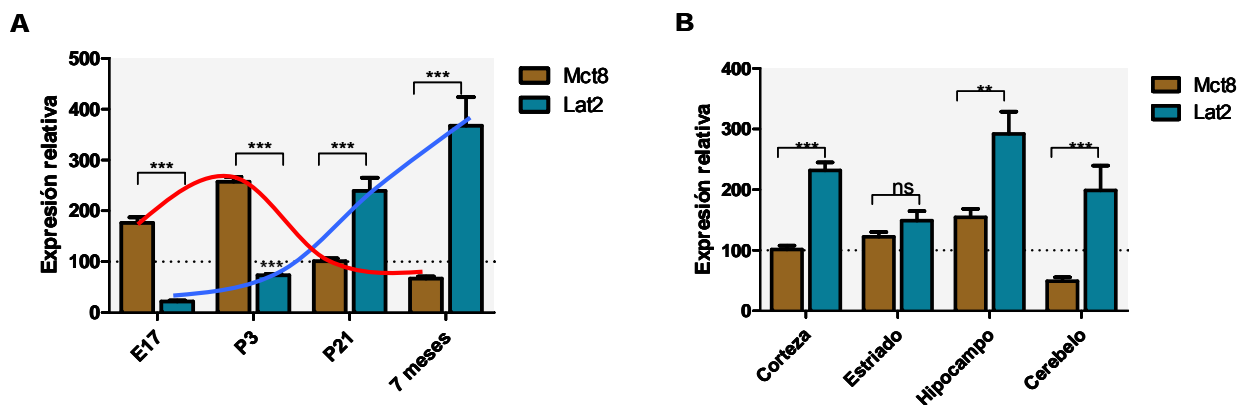
**Figura 26. Actividad de la desyodasa tipo 2 en corteza de animales P0 y P5 Wt, KO de *Mct8*, KO de *Lat2* y dobles KO de *Mct8Lat2*.** Las figuras muestran las determinaciones de la actividad desyodasa 2 en corteza cerebral a P0 (A) y a P5 (B) expresadas como actividad D2/mg proteína. Los datos se analizaron con el análisis estadístico MLG y el posterior test de Tukey. \*: P<0,05; \*\*: P<0,01; ns: no significativo. La significatividad estadística de cada grupo en relación con los animales Wt se representa sobre la barra correspondiente al grupo.

## 5. Expresión de transportadores

Para determinar el mecanismo por el cual *Mct8* y *Lat2* interaccionan entre si en las distintas edades y regiones, estudiamos la expresión de ambos transportadores.

### 5. 1 Expresión de *Mct8* y *Lat2* en cerebro mediante qPCR

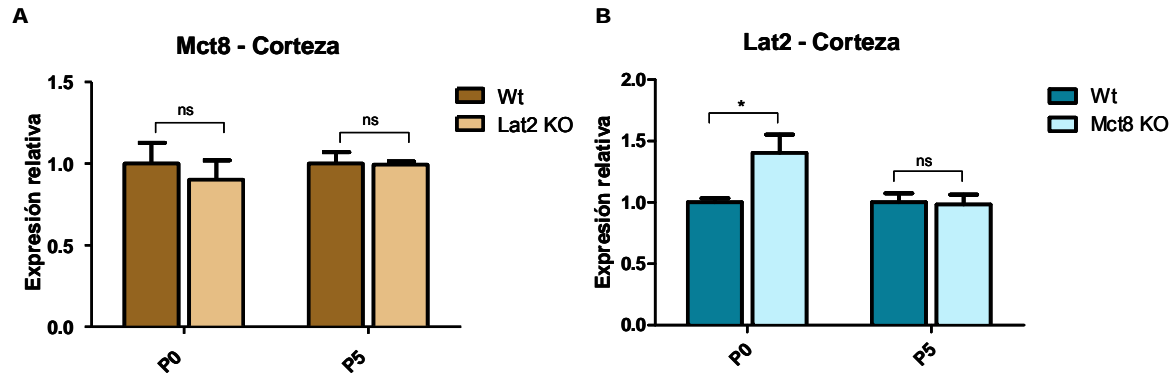
Como hemos comprobado en el capítulo anterior la interacción entre los dos transportadores varía en función del momento de desarrollo y de la región del cerebro. Quisimos valorar si la abundancia relativa entre los transportadores pudiese tener relación con los efectos observados a nivel de expresión génica. Para ello, hemos estudiado la expresión de los transportadores *Mct8* y *Lat2* en la corteza cerebral a lo largo del desarrollo mediante qPCR en animales Wt. En la figura 27A se representa la expresión de ambos transportadores a la edad embrionaria E17, posnatal P3 y P21, y en adultos. Como punto de referencia hemos tomado los niveles de expresión de *Mct8* a la edad de P21. Ambos transportadores presentan una expresión opuesta en el tiempo, mientras que el transportador *Mct8* resultó ser muy abundante en edades tempranas del desarrollo con su máxima expresión a P3, el transportador *Lat2* se expresa abundantemente en la edad adulta.



**Figura 27. Expresión mediante qPCR de *Mct8* y *Lat2* en encéfalo.** A: La figura muestra la expresión de los transportadores *Mct8* y *Lat2* en corteza de animales Wt a lo largo del desarrollo, desde la edad embrionaria E17 hasta la edad adulta. B: Se muestra la expresión de *Mct8* y *Lat2* en las distintas regiones encefálicas a la edad P21. Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos vías y el posterior test de Bonferroni. \*:  $P < 0,05$ ; \*\*:  $P < 0,01$ ; \*\*\*:  $P < 0,001$ ; ns: no significativo.

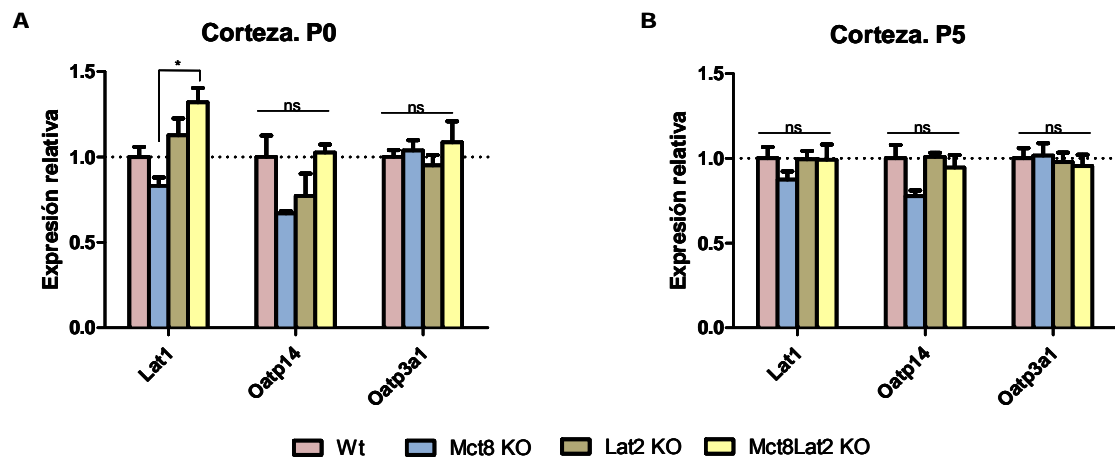
Para analizar la expresión relativa de ambos transportadores en las distintas regiones encefálicas medimos su expresión a la edad P21 en corteza, estriado, hipocampo y cerebelo (Fig.27B). El punto de referencia que hemos tomado en este caso es la expresión de *Mct8* en la corteza. A excepción del estriado donde no existían diferencias significativas en la expresión de ambos transportadores ( $P > 0,05$ ), tanto en la corteza como en el hipocampo y cerebelo la expresión de *Lat2* era aproximadamente el doble que de *Mct8* ( $P < 0,001$ ).

En el apartado 3 demostramos que el transportador *Lat2* tenía un papel transitorio en el transporte de HT en la corteza entre la edad P0 y P5 en animales mutantes de *Mct8*. Para comprobar si la delección de *Mct8* provocaba un aumento de la expresión de *Lat2* como mecanismo compensatorio, medimos la expresión de este transportador en animales KO de *Mct8* a la edad de P0 y P5 (Fig. 28B). La expresión del transportador *Lat2* se encontraba incrementada en animales KO de *Mct8* a la edad de P0 ( $P < 0,05$ ) pero no a P5 ( $P > 0,05$ ). Estos datos se correlacionan con los efectos observados en expresión génica, donde a P0 el *Lat2* es capaz de revertir el “hipertiroidismo” que produce la falta de *Mct8* en los animales dobles KO, mientras que a P5 esta normalización producida por *Lat2* ya no se observa. También comprobamos que la delección de *Lat2* no produce ningún cambio en la expresión de *Mct8* en ninguna de estas edades ( $P > 0,05$ ) (Fig. 28A).



**Figura 28. Expresión mediante qPCR de *Mct8* y *Lat2* en corteza cerebral de animales KO de *Lat2* y KO de *Mct8* respectivamente, a P0 y P5.** A: La figura muestra la expresión del transportador *Mct8* en animales Wt y KO de *Lat2* a P0 y P5. B: Se muestra la expresión de *Lat2* en animales deficientes de *Mct8* en comparación con animales Wt a P0 y P5. Los datos se analizaron mediante *unpaired* t-test. \*:  $P < 0,05$ ; ns: no significativo.

Con el fin de determinar si otros transportadores de HT estaban implicados en los cambios de expresión génica a P0 y P5 medimos la expresión de los transportadores *Lat1*, *Oatp14* y *Oatp3a1* en animales Wt, KO de *Mct8*, KO de *Lat2* y dobles KO. Ninguno de los transportadores presentaba alteraciones en su expresión en ninguno de los grupos analizados ni a la edad de P0 ni a P5 (Fig. 29).

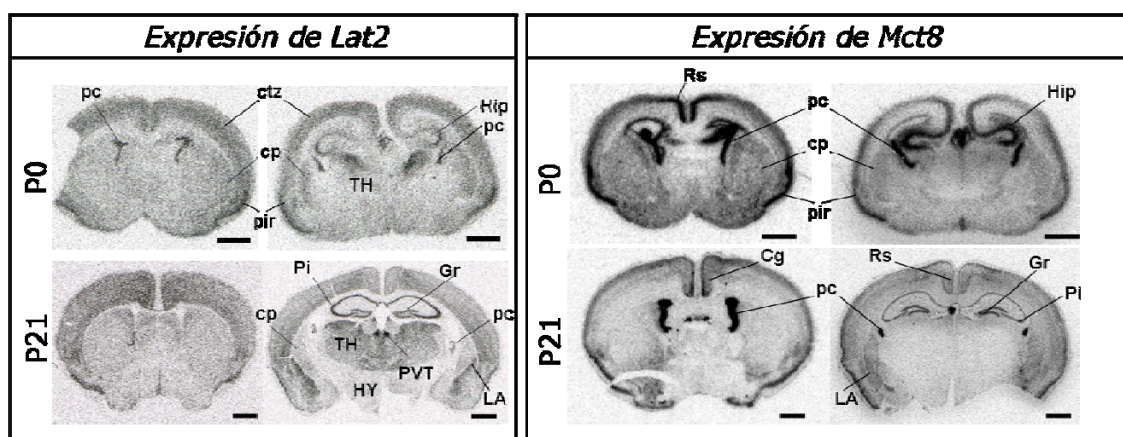


**Figura 29. Expresión de transportadores de HT en corteza cerebral a P0 y P5 de animales Wt, KO de *Mct8*, KO de *Lat2* y dobles KO de *Mct8Lat2*.** Las figuras muestran la expresión de los transportadores de HT *Lat1*, *Oatp14* y *Oatp3a1* en la corteza cerebral de animales Wt y de animales deficientes de *Mct8*, de *Lat2* o de ambos transportadores a la edad de P0 (A) y P5 (B). Los datos se analizaron con el análisis estadístico ANOVA de una vía y el posterior test de Tukey. \*:  $P < 0,05$ ; ns: no significativo.

## 5.2 Expresión de *Mct8* y *Lat2* en cerebro mediante hibridación *in situ*

Mediante hibridación *in situ* radiactiva analizamos la expresión de los ARNm de *Mct8* y *Lat2* en cortes coronales de cerebro de animales Wt a la edad de P0 y P21 (Fig. 30). A P0 *Lat2* se expresa en capas neocorticales, corteza piriforme, hipocampo, núcleo talámico, plexos coroideos y caudado *putamen*. A P21 *Lat2* muestra su expresión en neocorteza, corteza piriforme, capas piramidales y granulares del hipocampo, plexos coroideos, amígdala y tálamo (con mayor expresión en el núcleo paraventricular del tálamo). Presenta baja expresión en estriado y muy poca en hipotálamo. Este patrón de hibridación es compatible con una expresión predominante en neuronas.

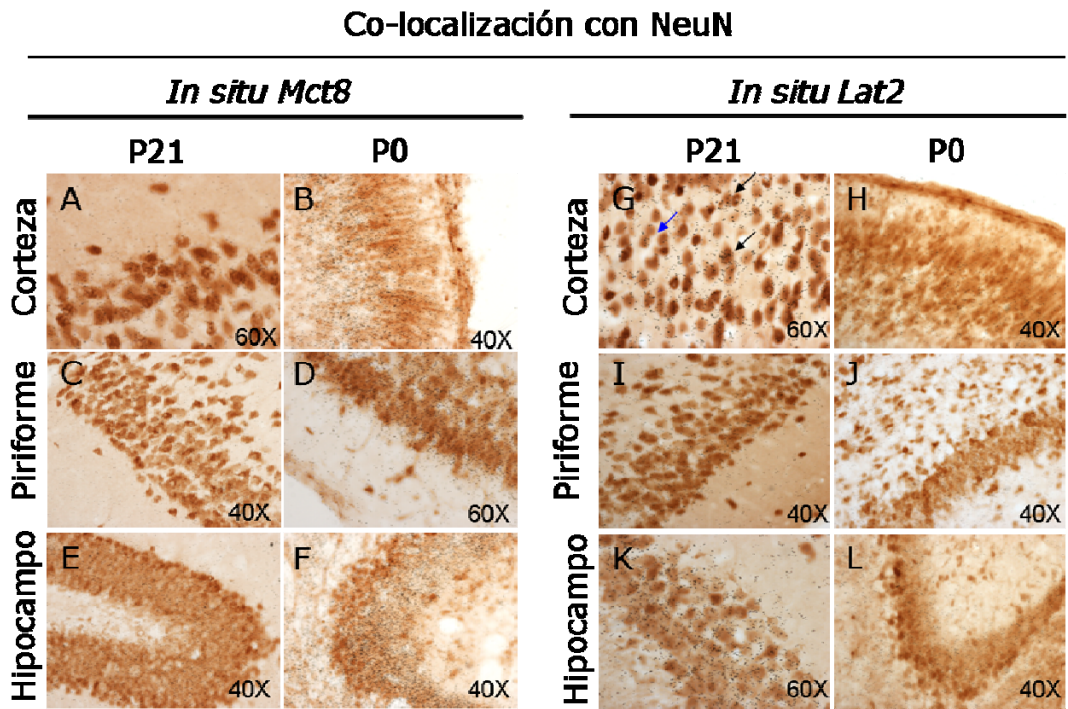
Por otro lado, *Mct8* también presenta un patrón de expresión neuronal aunque su máxima expresión aparece en los plexos coroideos de ambas edades. A P0 aparece expresado en corteza (con mayor expresión en corteza cingulada) y corteza piriforme, hipocampo, caudado *putamen* y plexos. A P21 se sigue expresando en corteza (con una expresión más alta en corteza cingulada y retrosplenial) y en corteza piriforme, hipocampo (con mayor intensidad en la capa granular del hipocampo), amígdala y plexos, presentando bajísima expresión en estriado y tálamo.



**Figura 30. Expresión de *Mct8* y *Lat2* mediante hibridación *in situ* radiactiva.** La figura muestra la expresión de *Mct8* y *Lat2* mediante hibridación *in situ* en cortes coronales de cerebro de animales Wt a P0 y P21 utilizando sonda de ARNm específica marcada con  $^{35}\text{S}$ -UTP. La hibridación *in situ* de *Mct8* se muestra sobreexpuesta con el fin de detectar las zonas de menor expresión. pc: plexo coroideo; ctz: neocorteza cerebral; cp: caudado-putamen; pir: corteza piriforme; Hip: hipocampo; TH: tálamo; PVT: núcleo talámico paraventricular; HY: hipotálamo; LA: amígdala lateral; Pi: capa piramidal del hipocampo; Gr: capa granular del giro dentado; Rs: corteza retrosplenial; Cg: corteza cingulada.

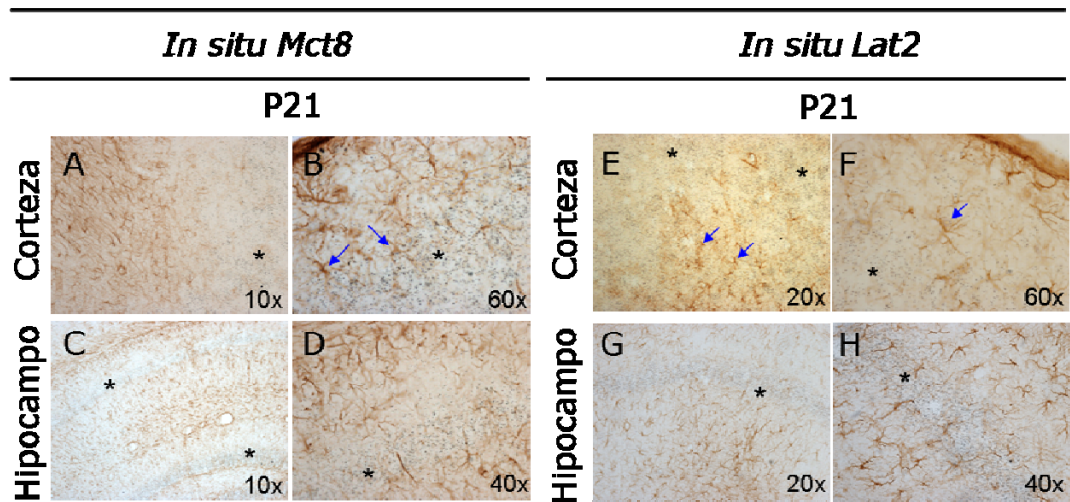


Para determinar en qué tipos celulares se expresan ambos transportadores realizamos hibridaciones *in situ* reveladas mediante emulsión autorradiográfica y combinadas con inmunohistoquímicas de marcadores de neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. En la figura 31 se observa que los granos de hibridación tanto de *Mct8* como de *Lat2* coinciden con la expresión de NeuN, marcador de neuronas, en corteza, corteza piriforme e hipocampo a P0 y P21 con cierta heterogeneidad; aparecen neuronas que no expresan los transportadores. Como marcador de astrocitos hemos utilizado GFAP. P0 es una edad demasiado temprana para la detección de astrocitos, sin embargo, sí lo hemos podido realizar a P21. La figura 32 muestra que tanto en corteza como en hipocampo los granos de hibridación de *Mct8* y *Lat2*, en general, no coinciden con las regiones donde la presencia de astrocitos es muy abundante. La proteína PDGFR $\alpha$  se utiliza como marcador de precursores de oligodendrocitos y pre-oligodendrocitos. A P21 aparecen dispersos de manera homogénea y no presentan un claro marcaje de *Mct8* ni de *Lat2*. A P0 son mucho más abundantes pero el grueso de granos de hibridación que indican la expresión de *Mct8* y *Lat2* no coincide con la distribución de este tipo celular (Fig. 33).



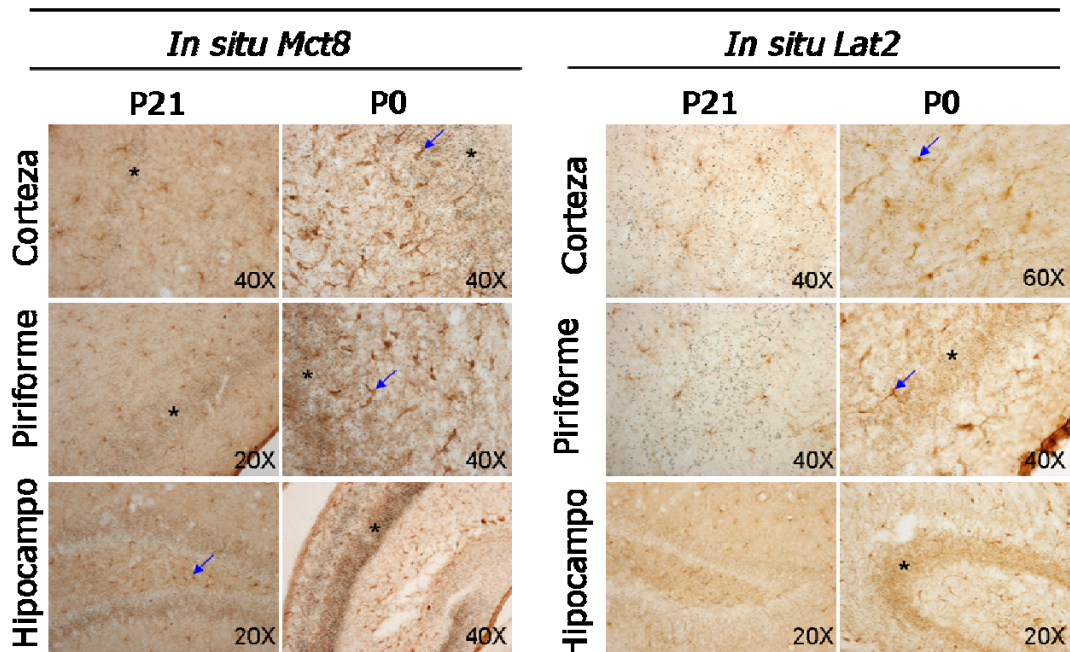
**Figura 31. Co-localización de *Mct8* y *Lat2* con el marcador de neuronas NeuN.** En la figura se muestra el marcaje de *Mct8* (A-F) y *Lat2* (G-L) mediante hibridación *in situ* sobre una inmunohistoquímica realizada con el marcador de neuronas NeuN en cortes coronales de cerebro de animales Wt a P0 y P21. Los granos de hibridación de ambos transportadores coinciden con el marcaje de NeuN indicando su expresión en neuronas con cierta heterogeneidad como se observa en la figura G donde se aprecian claramente neuronas con (flecha negra) y sin (flecha azul) marcaje.

### Co-localización con GFAP



**Figura 32. Co-localización de *Mct8* y *Lat2* con el marcador de astrocitos GFAP.** En la figura se muestra el marcaje de *Mct8* (A-D) y *Lat2* (E-H) mediante hibridación *in situ* sobre una inmunohistoquímica realizada con el marcador de astrocitos GFAP en cortes coronales de cerebro de animales Wt a la edad de P21. Los granos de hibridación de *Mct8* y *Lat2* no coinciden con el marcaje de astrocitos. \*: zonas con alto marcaje de *Mct8*/*Lat2*; Flecha azul: astrocitos sin granos de hibridación de *Mct8*/*Lat2*.

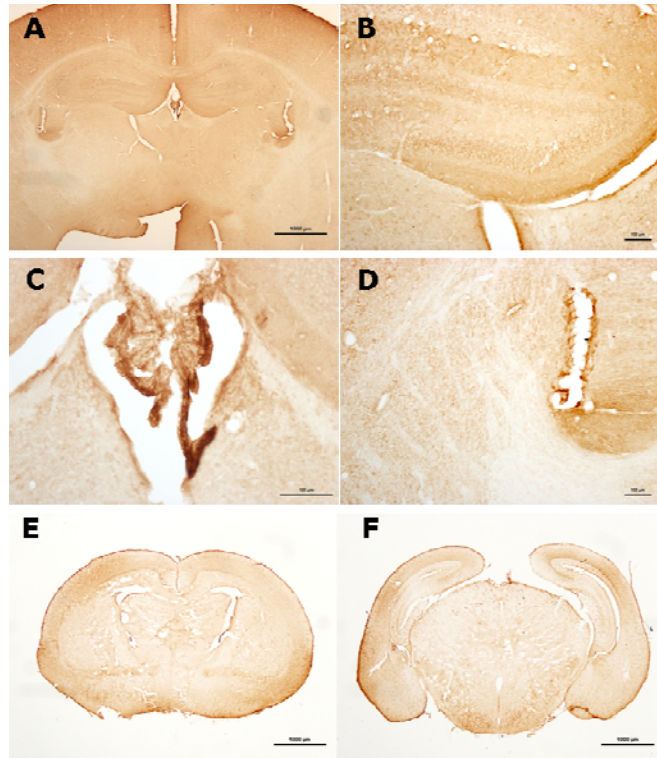
### Co-localización con PDGFR $\alpha$



**Figura 33. Co-localización de *Mct8* y *Lat2* con el marcador de pre-oligodendrocitos PDGFR $\alpha$ .** En la figura se muestra el marcaje de *Mct8* (A-F) y *Lat2* (G-L) mediante hibridación *in situ* sobre una inmunohistoquímica realizada con el marcador de pre-oligodendrocitos PDGFR $\alpha$  en cortes coronales de cerebro de animales Wt a la edad de P0 y P21. Los granos de hibridación de *Mct8* y *Lat2* no coinciden con el marcaje de este tipo celular. \*: zonas con alto marcaje de *Mct8*/*Lat2*; Flecha azul: pre-oligodendrocitos sin granos de hibridación de *Mct8*/*Lat2*.

### 5.3 Expresión de Lat2 en cerebro mediante inmunohistoquímica

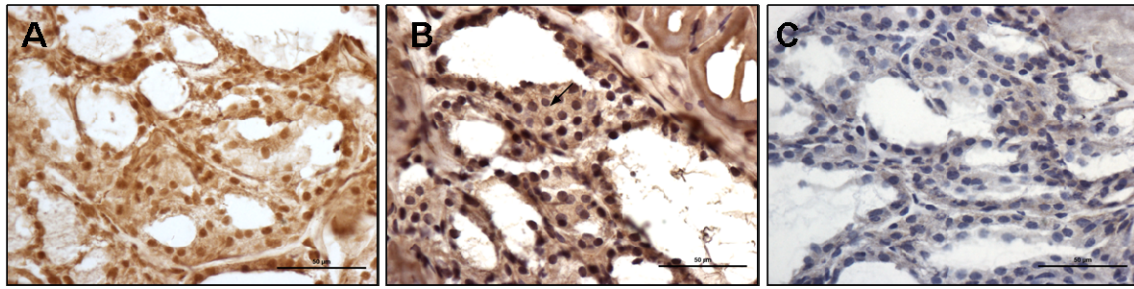
Para comprobar la localización de la proteína Lat2 realizamos inmunohistoquímicas sobre cortes coronales de cerebros de animales Wt a la edad de P0 y P21. El patrón de expresión coincide con el observado mediante hibridación *in situ*. Se observa marcaje en corteza, hipocampo, tálamo, plexos coroideos, amígdala y corteza piriforme (Fig. 34). El patrón de expresión algo borroso puede deberse a la presencia de la proteína en dendritas.



**Figura 34. Expresión de Lat2 mediante inmunohistoquímica en cortes coronales de cerebro de ratones Wt a la edad P21 y P0.** A-D: cortes coronales a P21; A: corte coronal de cerebro; B: hipocampo; C: plexo coroideo; D: ventrículo lateral y caudado-putamen. E, F: cortes coronales a P0.

Con el objetivo de determinar si Lat2 también se expresa en el tiroides, de manera que pudiera estar implicado en la secreción de HT, realizamos una inmunohistoquímica sobre cortes de tiroides de animales Wt adultos. No podemos concluir que Lat2 se exprese en la membrana de los tirocitos puesto que presentó un marcaje citoplasmático y nuclear. Sí aparecía en la membrana de las células parafoliculares (Fig.35).





**Figura 35. Expresión de Lat2 mediante inmunohistoquímica sobre cortes de tiroides.** La figura muestra la localización de Lat2 en cortes de tiroides de animales Wt adultos. A: inmunohistoquímica de Lat2 sin contrateñir con Richarson's Blue. Se pueden observar los folículos coloidales rodeados de tirocitos. Tinción en núcleo y citoplasma. B: inmunohistoquímica de Lat2 contrateñida con Richarson's Blue. Se puede observar Lat2 en la membrana de las células parafoliculares. C: control negativo contrateñido con Richarson's Blue.

Discusión



El síndrome de Allan-Herndon-Dudley (ORPHA59-OMIM300523) se debe a mutaciones en el transportador de HT MCT8, presentando el fenotipo más grave desde el punto de vista neurológico relacionado con la fisiopatología tiroidea. El cuadro neurológico se caracteriza por una alteración profunda del desarrollo cognitivo, incapacidad para hablar y alteraciones neuromotoras. La principal hipótesis sobre la patogenia del síndrome neurológico es que se debe a una entrada deficiente de T3 en las neuronas durante periodos críticos del desarrollo.

Para abordar el estudio fisiopatológico de esta enfermedad se crearon ratones deficientes de Mct8. Estos ratones, si bien reproducen las características endocrinas típicas del síndrome, no presentan alteraciones neurológicas, por lo que son sólo un modelo parcial de la enfermedad. A pesar de ello, han sido muy útiles para conocer el papel de Mct8 como transportador y los mecanismos compensadores que se ponen en marcha en su ausencia. Es posible que los ratones expresen un transportador distinto de Mct8 que pueda compensar el transporte de HT, justificando la falta de afectación neurológica.

Nuestra meta era conseguir un modelo de ratón que reprodujera la enfermedad también en sus trastornos neurológicos. Se ha especulado sobre la posibilidad de que existan diferentes patrones de expresión específicos de especie de los transportadores de HT entre humanos y ratones. Entre los posibles transportadores alternativos se encuentra Lat2. Wirth y cols. (Wirth, 2009), estudiaron el transportador LAT2 en cerebro humano demostrando su expresión en neuronas de adulto y su ausencia en neuronas fetales. Durante el desarrollo la expresión de LAT2 estaba restringida a la microglía. Estos autores proponen que, en ratones, Lat2 es un posible candidato al transporte alternativo de T3 durante el desarrollo neuronal, compensando la falta de Mct8 en los ratones KO. Chan y cols. (Chan, Martin-Santos et al. 2011), también demostraron una expresión significativamente menor de LAT2 en corteza fetal humana en comparación con los adultos. Estos precedentes nos llevaron a la generación de los dobles knock-out de *Mct8Lat2*. En este trabajo hemos analizado el efecto de la delección de *Lat2* en la acción de las HT en cerebro y el efecto que provoca la delección adicional de este transportador en animales deficientes de Mct8. De manera que la principal razón de este estudio ha sido evaluar la capacidad de Lat2 de actuar como transportador alternativo de HT en ausencia de Mct8.

Una dificultad que nos encontramos en el análisis de comparaciones múltiples entre las diferentes cepas de ratones era la posible influencia del ambiente materno en los resultados. La obtención de los 4 genotipos de ratones estudiados se realiza a partir de madres con dos genotipos diferentes, siendo ambas portadoras de *Mct8* pero KO de *Lat2* unas o *Lat2* Wt otras. Puesto que *Lat2* se expresa en la placenta y puede afectar al transporte de HT de la madre a los fetos decidimos aplicar un análisis estadístico que nos permitiera tener en cuenta esta posible interacción. Por lo tanto, incluimos en nuestros análisis de edad perinatal el posible efecto materno mediante el análisis estadístico Modelo Lineal General (MLG o MANOVA) mientras que los animales a partir de edad P21 se analizaron mediante ANOVA. Creemos que el posible efecto materno queda disipado al menos a partir de esta edad, y no consideramos necesario realizar el análisis MLG.

Los resultados obtenidos en animales a la edad de P21 y adultos difieren de los obtenidos en animales de edad perinatal y postnatal tardío y, por tanto, los discutiremos por separado.

## **1. Deficiencia de *Mct8* en ratones de edad P21 y adultos**

En animales P21 y adultos la delección de *Mct8* provoca las alteraciones endocrinas típicas del síndrome AHD, una T3 elevada, T4 disminuida y TSH normal de acuerdo con los rasgos endocrinos observados en pacientes (Dumitrescu, 2004; Friesema, 2004) y en concordancia con resultados previos descritos por (Dumitrescu, 2006; Trajkovic, 2007). Los mecanismos por los cuales se producen estas alteraciones endocrinas en respuesta a mutaciones en el transportador *Mct8* se explican en el apartado 4 de la introducción.

De acuerdo a los resultados descritos por los autores anteriormente mencionados, las elevadas concentraciones de T3 circulantes conducen en los animales KO de *Mct8* a un hipertiroidismo tisular extracerebral como indica la expresión del gen dependiente de T3 *Dio1* en hígado. Sin embargo, el estudio de procesos regulados por T3 corrobora los datos obtenidos por (Ceballos, 2009; Morte, 2010) en los que los ratones KO de *Mct8* presentan un hipotiroidismo parcial o totalmente compensado en la corteza cerebral, en cuanto a los niveles de expresión génica se refiere, y un aporte de T3 suficiente al cerebelo para su desarrollo normal. Wirth y cols. (Wirth, 2009) realizaron un amplio estudio de comportamiento concluyendo que los animales deficientes de *Mct8* no muestran alteraciones en la coordinación motora ni en la locomoción, indicativo de que no existe



daño neurológico aparente. Si bien detectaron disminución de la ansiedad e hiperalgesia en animales KO de *Mct8*.

## 2. Deficiencia de *Lat2* en ratones de edad P21 y adultos

La delección simple de *Lat2* produce una hipotiroxinemia menos acusada que la provocada por la falta de *Mct8*. Las causas de esta hipotiroxinemia son aún desconocidas pues el análisis inicial de algunas de las posibles explicaciones no ha dado resultados satisfactorios. Un posible factor sería la implicación de *Lat2* en la secreción de HT por el tiroides. Sin embargo, no hemos encontrado una clara evidencia de su expresión en la membrana de los tirocitos, y tampoco hay estudios previos de otros autores. Otra causa podría ser una alteración en la excreción renal de HT como ocurre en los ratones KO de *Mct8* en los que el aumento en la excreción de HT en orina posiblemente contribuye a los bajos niveles séricos de T4 (Trajkovic-Arsic, 2010b). *Lat2* tiene una expresión muy fuerte en los túbulos proximales renales y está implicado en la reabsorción de aminoácidos (Pineda, 1999; Rossier, 1999). A pesar de ello, en animales adultos KO de *Lat2* no se encontraron alteraciones en la excreción de HT (Braun, 2011b). Otra posibilidad que explicaría la disminución de T4 plasmática sería un incremento en el metabolismo de las HT. Esta opción también es poco probable pues los animales KO de *Lat2* no presentan aumentada la *Dio1* ni en hígado ni en riñón (Braun, 2011b) en contraste con la elevada actividad que presentan los KO de *Mct8* (Dumitrescu, 2006; Trajkovic, 2007).

Los resultados obtenidos por Braun y cols. (Braun, 2011b) de una cepa diferente de ratones KO de *Lat2* no mostraron alteraciones en las concentraciones de HT plasmáticas en contra de la hipotiroxinemia observada en nuestros animales. No conocemos la razón de la discrepancia, que puede ser debida a un efecto dependiente del fondo genético, pero coincidimos en que el transportador *Lat2* tiene en general poca relevancia en el transporte y metabolismo de las HT en comparación con el *Mct8*.

No se han publicado datos hasta la fecha de las concentraciones intracerebrales de HT en animales deficientes de *Lat2*. Nuestros resultados indican una ligera disminución de T3 y sorprendentemente un leve aumento de T4 difícil de explicar con estos datos. Es posible que la conversión de T4 a T3 sea deficiente provocando la acumulación de T4 y la menor producción de T3 o que la deficiencia de *Lat2* cause alteraciones en el “*influx/efflux*” de las HT en el cerebro. Sin embargo, al igual que ocurre con los animales deficientes de *Mct8* y de

acuerdo a los resultados de Braun y cols. (Braun, 2011b), el desarrollo del cerebelo y los estudios de expresión génica en ratones KO de *Lat2* no presentan cambios con respecto a los animales silvestres.

Las alteraciones motoras detectadas en el test del rotarod provocadas por la deficiencia de *Lat2* eran coincidentes con las detectadas por Braun y cols. (Braun, 2011b). Lo más probable es que esta alteración no esté causada por un fallo relacionado con la señalización de HT, sino con la función principal de *Lat2* de transportar aminoácidos (Pineda, 1999). Brevemente, en el ciclo del glutamato/GABA-glutamina cerebral existe un flujo de glutamato (sinapsis glutamatérgicas) o GABA (sinapsis GABAérgicas) desde el espacio extracelular hacia el interior de los astrocitos donde son transformados en glutamina con la utilización de un amonio libre ( $\text{NH}_4^+$ ). La glutamina es transportada al interior neuronal donde se generará nuevamente glutamato o GABA. Por cada molécula de glutamato o GABA generada en el ciclo se produce una molécula de amonio en las neuronas que tiene que ser transportada hasta los astrocitos para su eliminación puesto que elevadas concentraciones de amonio producen alteraciones en las funciones celulares. La homeostasis de amonio juega un papel fundamental en el ciclo, en el que la transferencia de los grupos amino ocurre gracias al transporte de alanina o leucina desde las neuronas hasta los astrocitos. Una reciente revisión sobre el ciclo, aspectos relacionados con el transporte y homeostasis de los neurotransmisores y la transferencia de amonio se detalla en (Bak, 2006). Tanto el glutamato como el GABA son importantes neurotransmisores y precisan unos sistemas de transporte específicos y muy eficientes para el correcto funcionamiento del ciclo. En este sentido, LAT2 muestra afinidad por el transporte de glutamina (Deitmer, 2003) y por el “*uptake*” de alanina (Broer, 2007) por astrocitos en cultivo. *Lat2* además puede actuar a nivel de la membrana neuronal. Numerosos estudios publicados demuestran que el ciclo glutamato/GABA-glutamina está afectado en gran variedad de desordenes neurológicos justificando la alteración neuromotora encontrada en los ratones deficientes de *Lat2*.

Podemos concluir que el fenotipo de los ratones KO de *Lat2* se caracteriza por aminoaciduria (Braun, 2011b), ligera hipotiroxinemia y una moderada alteración en la coordinación motora.

### **3. En ratones de edad P21 y adultos la delección adicional de *Lat2* no agrava el síndrome provocado por la deficiencia de *Mct8***

El punto más importante de este estudio era comprobar si la delección conjunta de *Mct8* y *Lat2* producía un agravamiento en la sintomatología de los ratones.

Los animales dobles KO de *Mct8Lat2* presentan un perfil tiroideo condicionado por la deficiencia de *Mct8*, con las mismas características que éstos. La expresión de *Dio1* en hígado muestra un hipertiroidismo tisular extracerebral propio de los animales deficientes de *Mct8* y las pruebas en busca de un hipotiroidismo cerebral no revelaron cambios con respecto a la delección simple de *Mct8*.

La única alteración neurológica observada en los ratones dobles KO de *Mct8Lat2* es la prueba de comportamiento del rotarod. Sin embargo, la delección de ambos transportadores no agrava la coordinación motora con respecto a los animales KO simples de *Lat2*. Por tanto, este fallo no está relacionado con la delección de *Mct8* y como se describe anteriormente, lo más probable es que la alteración esté causada por deficiencias en el transporte de aminoácidos a través de *Lat2*.

Podemos concluir que no se han encontrado alteraciones debidas a la combinación de la ausencia de ambos transportadores. *Lat2* no es el transportador alternativo responsable de compensar la deficiencia de *Mct8*, al menos en animales adultos.

### **4. La deficiencia de *Mct8* provoca un estado “hipertiroides cerebral” en edades posnatales tempranas**

En nuestro laboratorio nos preguntamos si en edades anteriores a P21 la respuesta a la delección de *Mct8* sería la misma y en qué momento del desarrollo comenzaba a detectarse la falta de HT en el cerebro. Sorprendentemente, los resultados de edades perinatales son contrarios a los descritos en animales P21 y adultos.

El mecanismo responsable del incremento de expresión de genes dependientes de T3 en corteza de animales deficientes de *Mct8* no está claro, pudiendo deberse a un

hipertiroidismo generalizado en el organismo o a un "hipertiroidismo local" restringido a la corteza cerebral.

#### 4.1 La ausencia de Mct8 provoca hipertiroxinemia en edades perinatales

La deficiencia de Mct8 provoca una tendencia a sufrir una relativa hipertiroxinemia en los recién nacidos. Este cambio hormonal es contrario a lo observado en adultos, en los que las concentraciones plasmáticas de T4 se encuentran disminuidas con respecto a los animales Wt. El origen de esta relativa hipertiroxinemia no parece ser la TSH, pues sus niveles no se encuentran incrementados a P0 en los animales KO de *Mct8* (Ferrara AM, 2013). Otras posibilidades podrían ser un aumento en el flujo de la T4 materna hacia los fetos KO de *Mct8*, una disminución en el metabolismo y/o excreción en estos animales. El metabolismo de las HT está controlado en gran medida por la actividad de las distintas desyodasas. La actividad de la D1 en hígado (datos no mostrados) a P0 es mínima y por tanto, la conversión de T4 a T3 es muy baja, con lo que no ocurre la disminución de T4 y el incremento de T3 observado en los adultos deficientes de Mct8 (Liao, 2011) que, en gran medida, es causada por un incremento de la actividad D1. Por otro lado, los animales adultos KO de *Mct8* presentan una excreción aumentada de T4 en relación con los Wt (Trajkovic-Arsic, 2010b). Esta diferencia podría no estar presente durante el periodo perinatal al ser el aparato renal todavía inmaduro. Adicionalmente, el “*influx*” y “*efflux*” dependiente de Mct8 puede alterar la distribución de las HT en tejidos específicos. De hecho, los resultados del laboratorio del Dr. Refetoff indican una baja concentración de rT3, lo que representaría menor acceso de T4 a los tejidos que expresan D3, entre ellos el cerebro (Ferrara AM, 2013).

Posteriormente, a P5 en los animales KO de *Mct8* está aumentada la expresión de *Dio1* en hígado, lo que sugiere que, aún cuando las diferencias de T3 plasmáticas no fueron estadísticamente significativas, a partir de esta edad comienzan las alteraciones típicas del síndrome AHD. A P5, los niveles circulantes de T4 comienzan a normalizarse, antes de que ocurra la disminución característica a partir de P21.

## 4.2 La delección de *Mct8* incrementa la acción de las hormonas tiroideas en cerebro en edad perinatal

La relativa hipertiroxinemia a P0 va acompañada de un incremento en la acción de HT en la corteza cerebral. A esta edad al menos 3 de los genes estudiados (*Hr*, *Sema7a*, *Klf9*) corroboran los datos previos en los que los animales KO de *Mct8* presentaban aumentada la expresión de genes regulados positivamente por T3. En contra de lo que cabría esperar, nuestros resultados indican falta de correlación entre las concentraciones de T3 en la corteza cerebral y la expresión génica. Esto podría ser debido a que la expresión génica medida a P0 es, en realidad, la consecuencia de la acción hormonal de al menos 24-48 horas antes, tiempo necesario para que la unión de la T3 al receptor se traduzca en incrementos significativos de ARNm de los genes regulados (Yen, 2003). Los datos de Ferrara y cols., que encontraron un incremento de T3 a E18 en cerebro de ratones KO de *Mct8*, apoyan esta explicación. Es posible que haya otras influencias para explicar estas discrepancias, como la hora exacta de nacimiento de las crías, o que *Mct8* esté implicado en los cambios de actividad del eje tiroideo que ocurren alrededor del nacimiento.

A P5, la acción de las HT en cerebro todavía se observa incrementada y en este caso se correlaciona con un aumento en las concentraciones de T3 en la corteza cerebral. Las razones del aumento de T3 en corteza de P5 (y posiblemente plasma, como vimos en el apartado anterior), y no a P0, no están claras. Es posible que, como ha sido sugerido, el déficit de *Mct8* en la glándula tiroides produzca un incremento relativo de la secreción de T3, que empezaría a manifestarse a esta edad. En todo caso, durante el período perinatal el cerebro de los animales deficientes de *Mct8* sería "hipertiroideo", en contra de lo que ocurre en edades posteriores.

El "hipertiroidismo cerebral" observado durante el período perinatal puede resultar paradójico si se tiene en cuenta la función propuesta para *Mct8* de facilitar el aporte de T3 a las células neuronales a través de la BHE o de la membrana plasmática como confirman los datos a P21 (Morte, 2010). Sin embargo, datos previos de nuestro laboratorio indican que *Mct8* parece no estar implicado con tanta relevancia en el aporte de T3 desde la circulación al cerebro hasta el desarrollo posnatal tardío. Esta idea se basa en que la entrada de T3 en el cerebro fetal durante el desarrollo normal está muy restringida de forma fisiológica, aún en presencia de una expresión elevada de *Mct8* (Calvo, 1990; Grijota-Martínez, 2011).

Creemos que el principal papel de Mct8 durante el período perinatal sería el acoplamiento funcional de éste transportador a la D3. La actividad de la D3 es muy alta en fetos y primeras etapas del desarrollo postnatal (Galton, 1999). Esta desyodasa tiene un importante papel en el control de las concentraciones de HT limitando la exposición de los tejidos a T3 (St Germain, 2009). La D3 degrada la T3 que procede directamente de la circulación a través de la BHE. De esta forma se mantiene un estricto control local de la disponibilidad de T3 en las neuronas, basado en el aporte desde los astrocitos a partir de la conversión de T4 por la acción de D2. A P0 la delección de *Dio3* produce el mismo efecto sobre los niveles de expresión génica que la delección de *Mct8*: un estado de “hipertiroidismo cerebral” (Hernandez, 2006). En nuestra hipótesis el acoplamiento de Mct8 y D3 sería requisito imprescindible para la degradación efectiva de HT por esta desyodasa. La presencia de mutaciones en Mct8 que pudieran alterar el acoplamiento impediría la adecuada degradación de las hormonas. En este sentido, la mayor parte de la T3 disponible para las neuronas en etapas perinatales es generada localmente a partir de T4, y la proporción de T3 proveniente de la circulación incrementa a lo largo del desarrollo, llegando a constituir aproximadamente un 50% de la T3 total del cerebro. En este modelo, la acumulación de T3 en cerebro de edad perinatal sería el resultado de fallos en la degradación debido a la ausencia de Mct8.

Otra posibilidad sería la participación de Mct8 en el “*efflux*” de HT en el cerebro (Friesema, 2008; Visser, 2008). Dos estudios apoyan este mecanismo: uno de ellos muestra que los fibroblastos humanos con MCT8 mutado tienen alterado el “*efflux*” de T3 y aumentada la expresión génica (Visser, 2009) y el otro demuestra que la glándula tiroidea de los ratones KO de *Mct8* secreta menos T4 y más T3 (Di Cosmo, 2010; Trajkovic-Arsic, 2010a). Cambios en el “*efflux*” afectarían a las concentraciones celulares de hormona.

## **5. El transportador Lat2 juega un papel relevante en el transporte de HT al cerebro durante la edad perinatal**

Lo primero a destacar es que la delección de *Lat2* en las madres gestantes no provoca un déficit de hormonas en sus crías probablemente debido a la presencia, entre otros transportadores, de Lat1 en la placenta supliendo su función. Ritchie y cols. en sus estudios con la línea celular humana BeWo (“*human placental choriocarcinoma cell line BeWo*”) confirmaron el transporte de yodotironinas a través de los transportadores LAT1 y LAT2,

proponiendo un importante papel de LAT1 en el aporte de HT al feto en desarrollo a través de la placenta (Ritchie, 2001).

A diferencia de lo descrito anteriormente en los animales deficientes de Mct8, la deficiencia de Lat2 no provoca alteraciones en las concentraciones plasmáticas de HT en edades tempranas posiblemente indicando la poca relevancia de este transportador al aporte general de estas hormonas. Estos datos sugieren que en la edad perinatal Lat2 no influye en la síntesis y secreción de HT por el tiroides, y que el metabolismo y excreción de las mismas no están alterados. Los resultados están de acuerdo con los observados en animales deficientes de Lat2 adultos en los que tan sólo una ligera hipotiroxinemia de causas desconocidas muestra un indicio de la posible regulación de HT por este transportador, confiriéndole un papel muy secundario con respecto a Mct8.

Sin embargo, los niveles de expresión de genes dependientes de T3 en la corteza indican que estos animales sufren un ligero hipotiroidismo cerebral el primer día de nacimiento a pesar de la presencia de Mct8. Las concentraciones de HT intracerebrales confirmaron este hecho, lo que indicaría un cierto papel de Lat2 en el paso de HT al cerebro en el período perinatal.

La generación de los ratones KO de *Lat2* es tan reciente que existen pocos estudios sobre su influencia en el transporte de HT *in vivo*. Los estudios publicados por Braun y cols. fueron realizados tan sólo en adultos sin aportar datos acerca de la función de este transportador durante el desarrollo (Braun, 2011b). Estos autores no encontraron indicios de afectación del transporte de HT a través de Lat2. Sin embargo, nuestros resultados en animales adultos demuestran un hipotiroidismo muy suave en la corteza similar al encontrado en animales perinatales.

Lat2 permitiría la entrada de las hormonas al cerebro probablemente a través de los plexos coroides donde se expresa fuertemente favoreciendo el intercambio de HT con el líquido céfalo-raquídeo. Además la presencia de Lat2 en neuronas sugiere su importancia en la regulación del flujo de T3 al interior neuronal como un transportador adicional a Mct8. Son necesarios estudios más exhaustivos que determinen la actuación de Lat2 en el cerebro en edades tempranas.

## 6. La deficiencia de Lat2 revierte el “hipertiroidismo” causado por la ausencia de Mct8 en animales dobles KO de edad perinatal

En los animales dobles KO de *Mct8Lat2* los niveles plasmáticos de HT están determinados por la deficiencia de Mct8, observándose a P0 la misma tendencia a presentar “hipertiroidismo” que la descrita en los animales con la delección simple de *Mct8*. Estos datos apoyan la poca relevancia de Lat2 en el control de los niveles circulantes de HT observado en los animales KO simples de *Lat2*, y las causas de la “hipertiroidismo” serían las mismas que las descritas para los animales KO de *Mct8*.

Curiosamente, en un primer momento tras el nacimiento (P0) se requiere la presencia de Lat2 para que los niveles de expresión génica aparezcan incrementados en animales deficientes de Mct8. El efecto “hipertiroidismo” que produce la falta de Mct8 a P0 sobre los niveles de expresión génica se revierte cuando el transportador Lat2 está adicionalmente delecionado. Por el contrario, en días posteriores (P5), el “hipertiroidismo” observado en los ratones KO de *Mct8* debe requerir la presencia de algún otro transportador y no de Lat2. A P5, la ausencia de Lat2 no consigue normalizar el “hipertiroidismo” que causa la deficiencia de Mct8 en los ratones dobles KO. El efecto provocado por Lat2 es transitorio.

Las concentraciones de HT en las cortezas de los ratones dobles KO de *Mct8Lat2* confirman estos datos: un “ligero hipotiroidismo” en los ratones dobles KO similar al encontrado en los animales KO simples de *Lat2* a P0 y un estado de “relativo hipertiroidismo” similar al causado por la deficiencia simple de Mct8 a P5.

Estudios previos demuestran que el cerebro fetal es crucialmente dependiente de la T4 circulante (Calvo, 1990). El principal aporte de T3 a las neuronas durante estadios fetales y posnatales tempranos deriva de la desyodación de la T4 en los astrocitos. A pesar de que se ha sugerido la implicación de Lat2 en la entrada de HT en los astrocitos (Friesema, 2001) (Braun, 2011a), en este estudio demostramos que *in vivo* Lat2 tiene una expresión principalmente neuronal, lo que abre la posibilidad de que su función sea facilitar la llegada a las neuronas de la T3 generada en astrocitos. Es posible que el “hipertiroidismo” local cerebral inducido por la deficiencia de Mct8 sea dependiente de un transporte adecuado de T3 a las neuronas, quizás facilitado por Lat2. De hecho, Lat2 está incrementado en la corteza cerebral de ratones KO de *Mct8* a P0, pero no en estadios más avanzados.



Cabe destacar que en ninguno de los genotipos estudiados, la D2 incrementa su actividad como mecanismo compensatorio de las deficiencias de Mct8 y/o de Lat2, al contrario de lo ocurrido en animales deficientes de Mct8 adultos en los que es característico el incremento de actividad de la D2 para compensar la deficiente entrada de T3 al cerebro (Dumitrescu, 2006; Trajkovic, 2007). Parece que este mecanismo compensatorio es activo a partir de la edad P21 y que en edades perinatales el mecanismo compensatorio se debe al aumento de transportadores alternativos que incrementan el flujo de HT al interior del cerebro cuando Mct8 no es funcional.

Las variaciones puntuales observadas entre genes probablemente se deban a la existencia de regiones o capas de la corteza en las que se acumule mayor cantidad de T3 generando diferencias micro-regionales. Además, existe gran heterogeneidad neuronal con diferencias de expresión de los transportadores de HT generando un control muy estricto de las concentraciones de T3 en las distintas células. Adicionalmente, los diferentes genes pueden presentar distintas sensibilidades regulándose con concentraciones de T3 variables.

Los datos sugieren una importante contribución del transportador Lat2 a las concentraciones de HT en la corteza cerebral y un papel relevante de Lat2 en el aporte de HT a las células diana en cerebro en etapas tempranas del desarrollo. Han de realizarse estudios más detallados de los mecanismos involucrados en estos procesos, pero se pueden plantear algunas hipótesis dentro del marco del mecanismo general de control de las concentraciones de T3 en el cerebro descritas en el siguiente apartado.

## **7. Flujo de hormonas tiroideas desde la barrera hematoencefálica a las células neurales**

El modelo que proponemos esquematizado en la figura 36 es el siguiente:

Las HT atraviesan la BHE principalmente a través de Mct8 y Oatp14. Mientras que Mct8 acepta T3 y T4, el transportador Oatp14 contribuye fundamentalmente al “*uptake*” de T4 (Roberts, 2008; Mayerl, 2012). Según nuestros resultados, el transportador Lat2 también está implicado en el aporte de HT al cerebro con un papel secundario en adultos y de mayor relevancia a P0.

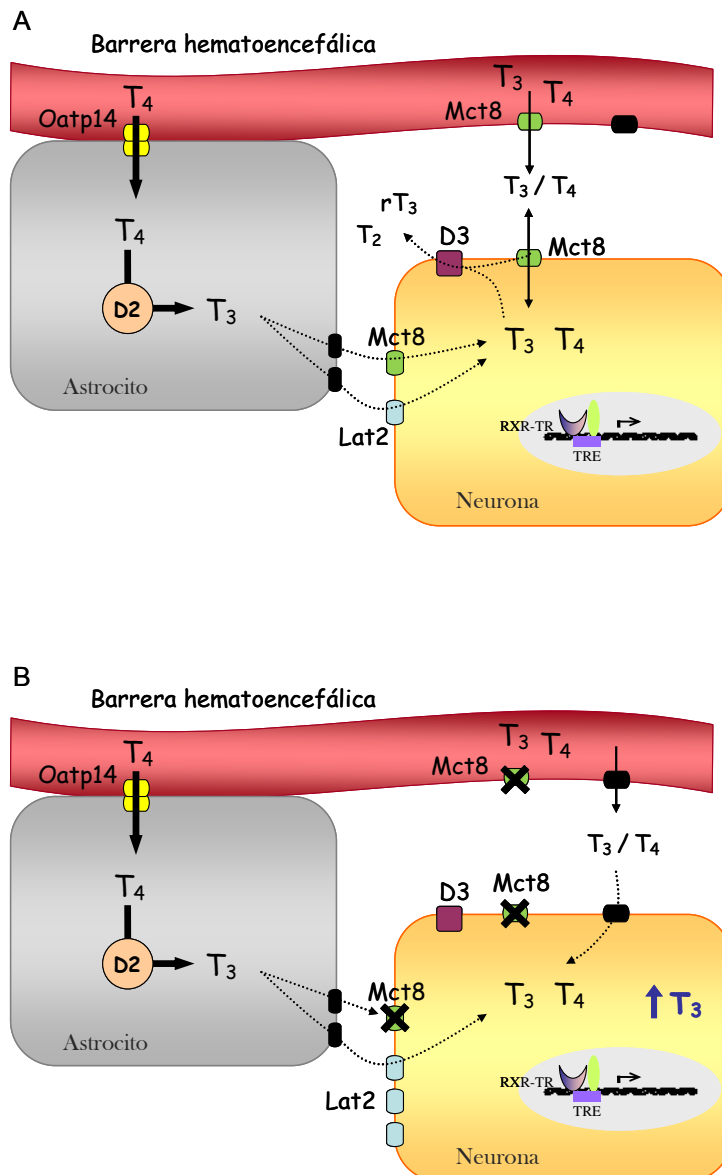
La hipótesis que ha planteado nuestro laboratorio es que el paso de T3 (y T4) a través de la BHE depositaría estas hormonas directamente en el espacio extracelular (Grijota-Martínez, 2011). Si, como han apuntado algunos autores (Baqui, 2003) la D3 de la membrana neuronal está orientada hacia el espacio extracelular, en el período perinatal, en el que la D3 posee la máxima actividad, las HT que cruzan la BHE sufrirían una rápida degradación. Este mecanismo asegura que, durante el desarrollo perinatal el principal aporte de T3 a las neuronas proceda de la conversión de T4 en los astrocitos.

La entrada de la T4 en los astrocitos es dependiente de la expresión de Oatp14. Este transportador se expresa en la BHE y en los pies de los astrocitos que la rodean permitiendo la entrada directa de T4 a los astrocitos evitando su degradación en el espacio extracelular. Tras su conversión a T3 por la acción de la D2 llega a las neuronas a través de Mct8 y/o Lat2 (Fig 36A).

De acuerdo a nuestros resultados la deficiencia de Mct8 a P0 provoca un incremento en el número de transportadores tipo Lat2 aumentando el flujo de HT al cerebro a través de este transportador. Nuestros resultados son compatibles con la idea de que en ausencia de Mct8 el transporte de T3 entre astrocitos y neuronas se realiza en gran medida a través de Lat2. Según la hipótesis del acoplamiento entre Mct8 y D3 para una degradación efectiva de las HT, mutaciones en Mct8 conducirían a una deficiente degradación de las hormonas y la consiguiente acumulación de T3 en las neuronas. Como resultado los niveles de expresión de genes dependientes de T3 aumentan (Fig. 36B).

Otra posibilidad sería la actuación de Mct8 en el “*efflux*” de T3 de las neuronas. La ausencia de Mct8 impediría la adecuada evacuación de T3, la cual se acumularía en el interior neuronal resultando en un fenotipo “hipertiroides”.

A medida que avanza el desarrollo el porcentaje de T3 que llega a las neuronas procedente de la circulación se incrementa, en paralelo a la disminución de la actividad de la D3, hasta que, a partir de P15 aproximadamente un 50% de la T3 que accede a las neuronas proviene directamente del torrente sanguíneo y un 50% de la conversión de T4 producida en los astrocitos. En esta situación el transporte de HT por Lat2 pierde relevancia.



**Figura 36. Flujo de HT desde la BHE a las células neurales.** A: En una situación normal, las HT cruzan la BHE a través de Mct8 quedando depositadas en el espacio extracelular. Durante el periodo perinatal las HT son rápidamente degradadas por la acción de la D3, la cual muestra su máxima actividad en este periodo. Las concentraciones de  $T_3$  estarían altamente controladas localmente, siendo la conversión de  $T_4$  a  $T_3$  por la acción de la D2 en los astrocitos la fuente principal de  $T_3$  hacia las neuronas. El transportador Oatp14 introduce  $T_4$  en los pies de los astrocitos que se encuentran en contacto directo con la BHE sin riesgo de degradación en el fluido extracelular. La  $T_3$  producida en los astrocitos es transportada a las neuronas a través de Mct8 y/o Lat2. B: Mutaciones en el transportador Mct8 conducen a una situación de relativo “hipertiroidismo cerebral” a la edad de P0. En ausencia de Mct8 la  $T_3$  astrocitaria sería transportada hacia las neuronas en gran medida a través de Lat2. Según la hipótesis del acoplamiento funcional entre Mct8 y D3 para una efectiva degradación de las HT, mutaciones en Mct8 conducirían a una menor degradación y, como consecuencia, la  $T_3$  se acumularía en las neuronas. El resultado sería que la expresión de genes dependientes de  $T_3$  se incrementa. Si Mct8 está implicado en el “efflux” de  $T_3$  de las neuronas, mutaciones en el mismo impedirían la adecuada evacuación de  $T_3$ , resultando también en un incremento de las concentraciones de  $T_3$  neuronales.

## 8. Oatp14, otro posible transportador alternativo para compensar la deficiencia de Mct8 en ratones

Entre los transportadores que juegan un importante papel en el aporte de HT al cerebro se encuentra el transportador Oatp14 (Oatp1c1). Funcionalmente, Oatp14 se ha caracterizado como un transportador independiente de  $\text{Na}^+$  que actúa bidireccionalmente con alta afinidad por el transporte de T4 (Pizzagalli, 2002; Sugiyama, 2003; Tohyama, 2004). En ratas y ratón, Oatp14 muestra una fuerte expresión en BHE y plexos coroideos. En cambio, en cerebro humano OATP14 es mucho menos abundante expresándose débilmente en capilares (Roberts, 2008). Estudios sobre el transporte de HT en ratones deficientes de Mct8 han demostrado una significativa reducción del “*uptake*” de T3 a través de la BHE o los plexos coroideos-líquido cefalorraquídeo sin que el transporte de T4 estuviera impedido (Ceballos, 2009). Basándose en su preferencia de sustrato y su patrón de expresión Oatp14 podría facilitar particularmente la entrada de T4 en el cerebro de ratón. Junto a Lat2, Oatp14 cumple los criterios para compensar la ausencia de Mct8 en roedores y causar la diferencia de fenotipo con respecto a los pacientes AHD.

Los ratones KO simples de *Oatp14* no presentan alteraciones en los niveles séricos de HT ni en el metabolismo periférico de estas hormonas, lo cual no es de extrañar porque Oatp14 tiene una expresión muy selectiva en el SNC (Sugiyama, 2003; Cheng, 2005). Sin embargo, el contenido de T3 y T4 cerebral está disminuido a pesar de la presencia de Mct8; la expresión de genes regulados positivamente por T3 se encuentra reducida, la actividad D2 incrementada y la actividad D3 también disminuida mostrando un estado hipotiroideo del SNC en ausencia de Oatp14 (Mayerl, 2012). Estos resultados subrayan la importancia de este transportador en la contribución de T4 al SNC de ratones.

Con el mismo fin que el trabajo presentado en esta tesis, el grupo de la Dra Heike Heuer ha generado recientemente ratones dobles KO de *Mct8/Oatp14*. Según los resultados preliminares presentados en la *ATA*, 2012 (S. Mayerl, 2012), los dobles KO de *Mct8/Oatp14* presentan una deficiente entrada de T4 en el SNC típica de la delección simple de *Oatp14*. Las concentraciones de T3 y T4 en el cerebro se encuentran drásticamente disminuidas mientras que la actividad de D2 aparece altamente incrementada. Han encontrado un estado hipotiroideo cerebral en ausencia de ambos transportadores con alteraciones en la expresión de genes regulados por T3, diferenciación de neuronas y

mielinización. Además estos animales muestran un déficit en los test de coordinación y locomoción. Según estos resultados parece que el doble KO de *Mct8/Oatp14* sería mejor modelo para estudiar el síndrome de Allan-Herndon-Dudley.



Conclusiones





1. Los ratones adultos dobles knock-out de *Mct8/Lat2* presentan las características endocrinas típicas del síndrome AHD, sin embargo no muestran un fenotipo de hipotiroidismo cerebral ni alteraciones neurológicas debidas a una deficiencia en el transporte de HT.
2. Lat2 no es el responsable de compensar el transporte de HT en ausencia de Mct8 en ratones adultos.
3. La delección simple de *Lat2* en animales adultos causa hipotiroxinemia, un ligero hipotiroidismo cerebral sin fenotipo aparente y una moderada alteración en la coordinación motora no relacionada con el transporte de HT.
4. La deficiencia de Mct8 provoca hipertiroxinemia y un relativo “hipertiroidismo cerebral” en edades perinatales.
5. De manera transitoria la ausencia de Lat2 revierte el “hipertiroidismo” causado por la delección de *Mct8* a P0.
6. Los datos sugieren una importante contribución del transportador Lat2 a las concentraciones de HT en la corteza cerebral, así como su implicación en el transporte de HT hacia las neuronas en ausencia de Mct8 durante el periodo perinatal.



## Bibliografía



- Allan, W., Herndon, C. N., Dudley, F. C. (1944). "Some examples of the inheritance of mental deficiency: apparently sex-linked idiocy and microcephaly." *Am. J. Ment. Defic.* 48: 325-334.
- Aranda, A. and A. Pascual (2001). "Nuclear hormone receptors and gene expression." *Physiol Rev* 81(3): 1269-1304.
- Bak, L. K., A. Schousboe and H. S. Waagepetersen (2006). "The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer." *J Neurochem* 98(3): 641-653.
- Baqui, M., D. Botero, B. Gereben, C. Curcio, J. W. Harney, D. Salvatore, K. Sorimachi, P. R. Larsen and A. C. Bianco (2003). "Human type 3 iodothyronine selenodeiodinase is located in the plasma membrane and undergoes rapid internalization to endosomes." *J Biol Chem* 278(2): 1206-1211.
- Bernal, J. (2007). "Thyroid hormone receptors in brain development and function." *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 3(3): 249-259.
- Bernal, J. (2011). "[Thyroid hormone resistance syndromes]." *Endocrinol Nutr* 58(4): 185-196.
- Bernal, J. and A. Guadano-Ferraz (2002). "Analysis of thyroid hormone-dependent genes in the brain by in situ hybridization." *Methods Mol Biol* 202: 71-90.
- Bernal, J., A. Guadaño-Ferraz and B. Morte (2003). "Perspectives in the study of thyroid hormone action on brain development and function." *Thyroid* 13(11): 1005-1012.
- Bochukova, E., N. Schoenmakers, M. Agostini, E. Schoenmakers, O. Rajanayagam, J. M. Keogh, E. Henning, J. Reinemund, E. Gevers, M. Sarri, K. Downes, A. Offiah, A. Albanese, D. Halsall, J. W. Schwabe, M. Bain, K. Lindley, F. Muntoni, F. Vargha-Khadem, M. Dattani, I. S. Farooqi, M. Gurnell and K. Chatterjee (2012). "A mutation in the thyroid hormone receptor alpha gene." *N Engl J Med* 366(3): 243-249.
- Braun, D., A. Kinne, A. U. Brauer, R. Sapin, M. O. Klein, J. Kohrle, E. K. Wirth and U. Schweizer (2011a). "Developmental and cell type-specific expression of thyroid hormone transporters in the mouse brain and in primary brain cells." *Glia* 59(3): 463-471.
- Braun, D., E. K. Wirth, F. Wohlgemuth, N. Reix, M. O. Klein, A. Gruters, J. Kohrle and U. Schweizer (2011b). "Aminoaciduria, but normal thyroid hormone levels and signalling, in mice lacking the amino acid and thyroid hormone transporter Slc7a8." *Biochem J* 439(2): 249-255.
- Broer, S. (2008). "Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia." *Physiol Rev* 88(1): 249-286.
- Broer, S., A. Broer, J. T. Hansen, W. A. Bubb, V. J. Balcar, F. A. Nasrallah, B. Garner and C. Rae (2007). "Alanine metabolism, transport, and cycling in the brain." *J Neurochem* 102(6): 1758-1770.
- Calvo, R., M. J. Obregon, C. Ruiz de Ona, F. Escobar del Rey and G. Morreale de Escobar (1990). "Congenital hypothyroidism, as studied in rats. Crucial role of maternal thyroxine but not of 3,5,3'-triiodothyronine in the protection of the fetal brain." *J Clin Invest* 86(3): 889-899.
- Ceballos, A., M. M. Belinchón, E. Sánchez-Mendoza, C. Grijota-Martínez, A. M. Dumitrescu, S. Refetoff, B. Morte and J. Bernal (2009). "Importance of monocarboxylate transporter 8 for the blood-brain barrier-dependent availability of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine." *Endocrinology* 150(5): 2491-2496.
- Chan, S. Y., A. Martin-Santos, L. S. Loubiere, A. M. Gonzalez, B. Stieger, A. Logan, C. J. McCabe, J. A. Franklyn and M. D. Kilby (2011). "The expression of thyroid hormone transporters in the human fetal cerebral cortex during early development and in N-Tera-2 neurodifferentiation." *J Physiol* 589(Pt 11): 2827-2845.
- Chen, J. D. and R. M. Evans (1995). "A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors." *Nature* 377(6548): 454-457.

- Cheng, S. Y., J. L. Leonard and P. J. Davis (2010). "Molecular aspects of thyroid hormone actions." *Endocr Rev* 31(2): 139-170.
- Cheng, X., J. Maher, C. Chen and C. D. Klaassen (2005). "Tissue distribution and ontogeny of mouse organic anion transporting polypeptides (Oatps)." *Drug Metab Dispos* 33(7): 1062-1073.
- Chiamolera, M. I. and F. E. Wondisford (2009). "Minireview: Thyrotropin-releasing hormone and the thyroid hormone feedback mechanism." *Endocrinology* 150(3): 1091-1096.
- Dai, G., O. Levy and N. Carrasco (1996). "Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter." *Nature* 379(6564): 458-460.
- de Escobar, G. M., M. J. Obregon and F. E. del Rey (2004). "Maternal thyroid hormones early in pregnancy and fetal brain development." *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 18(2): 225-248.
- Debernardi, R., K. Pierre, S. Lengacher, P. J. Magistretti and L. Pellerin (2003). "Cell-specific expression pattern of monocarboxylate transporters in astrocytes and neurons observed in different mouse brain cortical cell cultures." *J Neurosci Res* 73(2): 141-155.
- Deitmer, J. W., A. Broer and S. Broer (2003). "Glutamine efflux from astrocytes is mediated by multiple pathways." *J Neurochem* 87(1): 127-135.
- Delange, F. (1997). "Neonatal screening for congenital hypothyroidism: results and perspectives." *Horm Res* 48(2): 51-61.
- DeLong, G. R., J. B. Stanbury and R. Fierro-Benitez (1985). "Neurological signs in congenital iodine-deficiency disorder (endemic cretinism)." *Dev Med Child Neurol* 27(3): 317-324.
- Di Cosmo, C., X. H. Liao, A. M. Dumitrescu, N. J. Philp, R. E. Weiss and S. Refetoff (2010). "Mice deficient in MCT8 reveal a mechanism regulating thyroid hormone secretion." *J Clin Invest* 120(9): 3377-3388.
- Di Cosmo, C., X. H. Liao, A. M. Dumitrescu, R. E. Weiss and S. Refetoff (2009). "A thyroid hormone analog with reduced dependence on the monocarboxylate transporter 8 for tissue transport." *Endocrinology* 150(9): 4450-4458.
- Dubuis, J. M., J. Glorieux, F. Richer, C. L. Deal, J. H. Dussault and G. Van Vliet (1996). "Outcome of severe congenital hypothyroidism: closing the developmental gap with early high dose levothyroxine treatment." *J Clin Endocrinol Metab* 81(1): 222-227.
- Dumitrescu, A. M., X. H. Liao, T. B. Best, K. Brockmann and S. Refetoff (2004). "A novel syndrome combining thyroid and neurological abnormalities is associated with mutations in a monocarboxylate transporter gene." *Am J Hum Genet* 74(1): 168-175.
- Dumitrescu, A. M., X. H. Liao, R. E. Weiss, K. Millen and S. Refetoff (2006). "Tissue-specific thyroid hormone deprivation and excess in monocarboxylate transporter (mct) 8-deficient mice." *Endocrinology* 147(9): 4036-4043.
- Edwards, R. H. (2007). "The neurotransmitter cycle and quantal size." *Neuron* 55(6): 835-858.
- Escámez, M. J., A. Guadaño-Ferraz, A. Cuadrado and J. Bernal (1999). "Type 3 iodothyronine deiodinase is selectively expressed in areas related to sexual differentiation in the newborn rat brain." *Endocrinology* 140(11): 5443-5446.
- Ferrara AM, X.-H. L., Pilar Gil-Ibáñez, Teresa Marcinkowski, Juan Bernal, Roy E. Weiss, Alexandra M. Dumitrescu, Samuel Refetoff (2013). "Changes in thyroid status during perinatal development of mct8 deficient male mice." *Endocrinology*, enviado a publicar.
- Flamant, F., J. D. Baxter, D. Forrest, S. Refetoff, H. Samuels, T. S. Scanlan, B. Vennstrom and J. Samarut (2006). "International Union of Pharmacology. LIX. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: thyroid hormone receptors." *Pharmacol Rev* 58(4): 705-711.

- Font-Llitjós M, E. M., others "Manuscript in preparation."
- Friesema, E. C., R. Docter, E. P. Moerings, F. Verrey, E. P. Krenning, G. Hennemann and T. J. Visser (2001). "Thyroid hormone transport by the heterodimeric human system L amino acid transporter." *Endocrinology* 142(10): 4339-4348.
- Friesema, E. C., S. Ganguly, A. Abdalla, J. E. Manning Fox, A. P. Halestrap and T. J. Visser (2003). "Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter." *J Biol Chem* 278(41): 40128-40135.
- Friesema, E. C., A. Grueters, H. Biebermann, H. Krude, A. von Moers, M. Reeser, T. G. Barrett, E. E. Mancilla, J. Svensson, M. H. Kester, G. G. Kuiper, S. Balkassmi, A. G. Uitterlinden, J. Koehrlé, P. Rodien, A. P. Halestrap and T. J. Visser (2004). "Association between mutations in a thyroid hormone transporter and severe X-linked psychomotor retardation." *Lancet* 364(9443): 1435-1437.
- Friesema, E. C., J. Jansen, J. W. Jachtenberg, W. E. Visser, M. H. Kester and T. J. Visser (2008). "Effective cellular uptake and efflux of thyroid hormone by human monocarboxylate transporter 10." *Mol Endocrinol* 22(6): 1357-1369.
- Friesema, E. C., J. Jansen, C. Milici and T. J. Visser (2005). "Thyroid hormone transporters." *Vitam Horm* 70: 137-167.
- Friesema, E. C., G. G. Kuiper, J. Jansen, T. J. Visser and M. H. Kester (2006). "Thyroid hormone transport by the human monocarboxylate transporter 8 and its rate-limiting role in intracellular metabolism." *Mol Endocrinol* 20(11): 2761-2772.
- Frints, S. G., S. Lenzner, M. Bauters, L. R. Jensen, H. Van Esch, V. des Portes, U. Moog, M. V. Macville, K. van Roozendaal, C. T. Schrander-Stumpel, A. Tzschach, P. Marynen, J. P. Fryns, B. Hamel, H. van Bokhoven, J. Chelly, C. Beldjord, G. Turner, J. Gecz, C. Moraine, M. Raynaud, H. H. Ropers, G. Froyen and A. W. Kuss (2008). "MCT8 mutation analysis and identification of the first female with Allan-Herndon-Dudley syndrome due to loss of MCT8 expression." *Eur J Hum Genet* 16(9): 1029-1037.
- Fuchs, O., N. Pfarr, J. Pohlenz and H. Schmidt (2009). "Elevated serum triiodothyronine and intellectual and motor disability with paroxysmal dyskinesia caused by a monocarboxylate transporter 8 gene mutation." *Dev Med Child Neurol* 51(3): 240-244.
- Galton, V. A., E. Martinez, A. Hernandez, E. A. St Germain, J. M. Bates and D. L. St Germain (1999). "Pregnant rat uterus expresses high levels of the type 3 iodothyronine deiodinase." *J Clin Invest* 103(7): 979-987.
- Gavaret, J. M., H. J. Cahnmann and J. Nunez (1981). "Thyroid hormone synthesis in thyroglobulin. The mechanism of the coupling reaction." *J Biol Chem* 256(17): 9167-9173.
- Gereben, B., A. M. Zavacki, S. Ribich, B. W. Kim, S. A. Huang, W. S. Simonides, A. Zeold and A. C. Bianco (2008a). "Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling." *Endocr Rev* 29(7): 898-938.
- Gereben, B., A. Zeold, M. Dentice, D. Salvatore and A. C. Bianco (2008b). "Activation and inactivation of thyroid hormone by deiodinases: local action with general consequences." *Cell Mol Life Sci* 65(4): 570-590.
- Glass, C. K. and M. G. Rosenfeld (2000). "The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors." *Genes Dev* 14(2): 121-141.
- Gordon, J. T., F. L. Crutchfield, A. S. Jennings and M. B. Dratman (1982). "Preparation of lipid-free tissue extracts for chromatographic determination of thyroid hormones and metabolites." *Arch Biochem Biophys* 216(2): 407-415.
- Grijota-Martinez, C., D. Diez, G. Morreale de Escobar, J. Bernal and B. Morte (2011). "Lack of action of exogenously administered T3 on the fetal rat brain despite expression of the monocarboxylate transporter 8." *Endocrinology* 152(4): 1713-1721.

- Grunstein, M. (1997). "Histone acetylation in chromatin structure and transcription." *Nature* 389(6649): 349-352.
- Guadaño-Ferraz, A., M. J. Escámez, E. Rausell and J. Bernal (1999). "Expression of type 2 iodothyronine deiodinase in hypothyroid rat brain indicates an important role of thyroid hormone in the development of specific primary sensory systems." *J Neurosci* 19(9): 3430-3439.
- Guadaño-Ferraz, A., M. J. Obregón, D. L. St Germain and J. Bernal (1997). "The type 2 iodothyronine deiodinase is expressed primarily in glial cells in the neonatal rat brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(19): 10391-10396.
- Hernandez, A., M. E. Martinez, S. Fiering, V. A. Galton and D. St Germain (2006). "Type 3 deiodinase is critical for the maturation and function of the thyroid axis." *J Clin Invest* 116(2): 476-484.
- Hernandez, A., B. Morte, M. M. Belinchon, A. Ceballos and J. Bernal (2012). "Critical role of types 2 and 3 deiodinases in the negative regulation of gene expression by T(3) in the mouse cerebral cortex." *Endocrinology* 153(6): 2919-2928.
- Hernández, A. and M. J. Obregón (1996). "T3 potentiates the adrenergic stimulation of type II 5'-deiodinase activity in cultured rat brown adipocytes." *Am J Physiol* 271(1 Pt 1): E15-23.
- Heuer, H., M. K. Maier, S. Iden, J. Mittag, E. C. Friesema, T. J. Visser and K. Bauer (2005). "The monocarboxylate transporter 8 linked to human psychomotor retardation is highly expressed in thyroid hormone-sensitive neuron populations." *Endocrinology* 146(4): 1701-1706.
- Holden, K. R., O. F. Zuniga, M. M. May, H. Su, M. R. Molinero, R. C. Rogers and C. E. Schwartz (2005). "X-linked MCT8 gene mutations: characterization of the pediatric neurologic phenotype." *J Child Neurol* 20(10): 852-857.
- Kleinau, G., U. Schweizer, A. Kinne, J. Kohrle, A. Gruters, H. Krude and H. Biebermann (2011). "Insights into molecular properties of the human monocarboxylate transporter 8 by combining functional with structural information." *Thyroid Res* 4 Suppl 1: S4.
- Köhrle, J. (2002). "Iodothyronine deiodinases." *Methods Enzymol* 347: 125-167.
- Kooistra, L., S. Crawford, A. L. van Baar, E. P. Brouwers and V. J. Pop (2006). "Neonatal effects of maternal hypothyroxinemia during early pregnancy." *Pediatrics* 117(1): 161-167.
- Lafreniere, R. G., L. Carrel and H. F. Willard (1994). "A novel transmembrane transporter encoded by the XPCT gene in Xq13.2." *Hum Mol Genet* 3(7): 1133-1139.
- Lamas, L. and A. Taurog (1977). "The importance of thyroglobulin structure in thyroid peroxidase-catalyzed conversion of diiodotyrosine to thyroxine." *Endocrinology* 100(4): 1129-1136.
- Laura López Marín, M. M.-B., Luis G. Gutiérrez-Solana, Beatriz Morte Molina, Juan Bernal (2013). "Deficiencia del transportador celular de hormona tiroidea MCT8." *Neurología*, en prensa.
- Leonard, J. L. and I. N. Rosenberg (1980). "Iodothyronine 5'-deiodinase from rat kidney: substrate specificity and the 5'-deiodination of reverse triiodothyronine." *Endocrinology* 107(5): 1376-1383.
- Li, Q., L. Sachs, Y. B. Shi and A. P. Wolffe (1999). "Modification of Chromatin Structure by the Thyroid Hormone Receptor." *Trends Endocrinol Metab* 10(4): 157-164.
- Liao, X. H., C. Di Cosmo, A. M. Dumitrescu, A. Hernandez, J. Van Sande, D. L. St Germain, R. E. Weiss, V. A. Galton and S. Refetoff (2011). "Distinct roles of deiodinases on the phenotype of Mct8 defect: a comparison of eight different mouse genotypes." *Endocrinology* 152(3): 1180-1191.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *J Biol Chem* 193(1): 265-275.



- Mastroberardino, L., B. Spindler, R. Pfeiffer, P. J. Skelly, J. Loffing, C. B. Shoemaker and F. Verrey (1998). "Amino-acid transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family." *Nature* 395(6699): 288-291.
- Mayerl, S., T. J. Visser, V. M. Darras, S. Horn and H. Heuer (2012). "Impact of Oatp1c1 deficiency on thyroid hormone metabolism and action in the mouse brain." *Endocrinology* 153(3): 1528-1537.
- McCarrison, R., (1917). "Endemic Cretinism. In *The thyroid gland in health and disease.*" Edition London: Baillière, Tindall and Cox 124-147.
- Meier, C., Z. Ristic, S. Klauser and F. Verrey (2002). "Activation of system L heterodimeric amino acid exchangers by intracellular substrates." *EMBO J* 21(4): 580-589.
- Morreale de Escobar, G., M. J. Obregon and F. Escobar del Rey (2004). "Role of thyroid hormone during early brain development." *Eur J Endocrinol* 151 Suppl 3: U25-37.
- Morreale de Escobar, G., R. Pastor, M. J. Obregón and F. Escobar del Rey (1985). "Effects of maternal hypothyroidism on the weight and thyroid hormone content of rat embryonic tissues, before and after onset of fetal thyroid function." *Endocrinology* 117(5): 1890-1900.
- Morte, B., A. Ceballos, D. Díez, C. Grijota-Martínez, A. M. Dumitrescu, C. Di Cosmo, V. A. Galton, S. Refetoff and J. Bernal (2010). "Thyroid hormone-regulated mouse cerebral cortex genes are differentially dependent on the source of the hormone: a study in monocarboxylate transporter-8- and deiodinase-2-deficient mice." *Endocrinology* 151(5): 2381-2387.
- Obregon, M. J., R. M. Calvo, F. E. Del Rey and G. M. de Escobar (2007). "Ontogenesis of thyroid function and interactions with maternal function." *Endocr Dev* 10: 86-98.
- Obregón, M. J., G. Morreale de Escobar and F. Escobar del Rey (1978). "Concentrations of triiodo-L-thyronine in the plasma and tissues of normal rats, as determined by radioimmunoassay: comparison with results obtained by an isotopic equilibrium technique." *Endocrinology* 103(6): 2145-2153.
- Oetting, A. and P. M. Yen (2007). "New insights into thyroid hormone action." *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 21(2): 193-208.
- Pallier, P. N., C. J. Drew and A. J. Morton (2009). "The detection and measurement of locomotor deficits in a transgenic mouse model of Huntington's disease are task- and protocol-dependent: influence of non-motor factors on locomotor function." *Brain Res Bull* 78(6): 347-355.
- Petty, K. J. (1995). "Tissue- and cell-specific distribution of proteins that interact with the human thyroid hormone receptor-beta." *Mol Cell Endocrinol* 108(1-2): 131-142.
- Pharoah, P. O., I. H. Butfield and B. S. Hetzel (1972). "The effect of iodine prophylaxis on the incidence of endemic cretinism." *Adv Exp Med Biol* 30: 201-221.
- Pineda, M., E. Fernandez, D. Torrents, R. Estevez, C. Lopez, M. Camps, J. Lloberas, A. Zorzano and M. Palacin (1999). "Identification of a membrane protein, LAT-2, that Co-expresses with 4F2 heavy chain, an L-type amino acid transport activity with broad specificity for small and large zwitterionic amino acids." *J Biol Chem* 274(28): 19738-19744.
- Pizzagalli, F., B. Hagenbuch, B. Stieger, U. Klenk, G. Folkers and P. J. Meier (2002). "Identification of a novel human organic anion transporting polypeptide as a high affinity thyroxine transporter." *Mol Endocrinol* 16(10): 2283-2296.
- Pohlenz, J., A. Maqueem, K. Cua, R. E. Weiss, J. Van Sande and S. Refetoff (1999). "Improved radioimmunoassay for measurement of mouse thyrotropin in serum: strain differences in thyrotropin concentration and thyrotroph sensitivity to thyroid hormone." *Thyroid* 9(12): 1265-1271.
- Pop, V. J., J. L. Kuypens, A. L. van Baar, G. Verkerk, M. M. van Son, J. J. de Vijlder, T. Vulsma, W. M. Wiersinga, H. A. Drexhage and H. L. Vader (1999). "Low maternal free thyroxine

- concentrations during early pregnancy are associated with impaired psychomotor development in infancy." *Clin Endocrinol (Oxf)* 50(2): 149-155.
- Pop, V. J. and T. Vulsma (2005). "Maternal hypothyroxinaemia during (early) gestation." *Lancet* 365(9471): 1604-1606.
- Porterfield, S. P. and C. E. Hendrich (1993). "The role of thyroid hormones in prenatal and neonatal neurological development--current perspectives." *Endocr Rev* 14(1): 94-106.
- Rafiki, A., J. L. Boulland, A. P. Halestrap, O. P. Ottersen and L. Bergersen (2003). "Highly differential expression of the monocarboxylate transporters MCT2 and MCT4 in the developing rat brain." *Neuroscience* 122(3): 677-688.
- Ramos, H. E., M. Morandini, A. Carre, E. Tron, C. Floch, L. Mandelbrot, N. Neri, B. De Sarcus, A. Simon, J. P. Bonnefont, J. Amiel, I. Desguerre, V. Valayannopoulos, M. Castanet and M. Polak (2011). "Pregnancy in women heterozygous for MCT8 mutations: risk of maternal hypothyroxinemia and fetal care." *Eur J Endocrinol* 164(2): 309-314.
- Ritchie, J. W. and P. M. Taylor (2001). "Role of the System L permease LAT1 in amino acid and iodothyronine transport in placenta." *Biochem J* 356(Pt 3): 719-725.
- Roberts, L. M., K. Woodford, M. Zhou, D. S. Black, J. E. Haggerty, E. H. Tate, K. K. Grindstaff, W. Mengesha, C. Raman and N. Zerangue (2008). "Expression of the thyroid hormone transporters monocarboxylate transporter-8 (SLC16A2) and organic ion transporter-14 (SLCO1C1) at the blood-brain barrier." *Endocrinology* 149(12): 6251-6261.
- Rossier, G., C. Meier, C. Bauch, V. Summa, B. Sordat, F. Verrey and L. C. Kuhn (1999). "LAT2, a new basolateral 4F2hc/CD98-associated amino acid transporter of kidney and intestine." *J Biol Chem* 274(49): 34948-34954.
- Ruiz de Oña, C., G. Morreale de Escobar, R. Calvo, F. Escobar del Rey and M. J. Obregón (1991). "Thyroid hormones and 5'-deiodinase in the rat fetus late in gestation: effects of maternal hypothyroidism." *Endocrinology* 128(1): 422-432.
- S. Mayerl, T. V., R. Bauer, V.M. Darras, H. Heuer (2012). "Consequences of brain-specific thyroid hormone deprivation in Mct8/Oatp1c1 double knockout mice." *American Thyroid Association*.
- Sap, J., A. Muñoz, J. Schmitt, H. Stunnenberg and B. Vennström (1989). "Repression of transcription mediated at a thyroid hormone response element by the v-erb-A oncogene product." *Nature* 340(6230): 242-244.
- Schwartz, C. E., M. M. May, N. J. Carpenter, R. C. Rogers, J. Martin, M. G. Bialer, J. Ward, J. Sanabria, S. Marsa, J. A. Lewis, R. Echeverri, H. A. Lubs, K. Voeller, R. J. Simensen and R. E. Stevenson (2005). "Allan-Herndon-Dudley syndrome and the monocarboxylate transporter 8 (MCT8) gene." *Am J Hum Genet* 77(1): 41-53.
- St Germain, D. L., V. A. Galton and A. Hernandez (2009). "Minireview: Defining the roles of the iodothyronine deiodinases: current concepts and challenges." *Endocrinology* 150(3): 1097-1107.
- Sugiyama, D., H. Kusuhara, H. Taniguchi, S. Ishikawa, Y. Nozaki, H. Aburatani and Y. Sugiyama (2003). "Functional characterization of rat brain-specific organic anion transporter (Oatp14) at the blood-brain barrier: high affinity transporter for thyroxine." *J Biol Chem* 278(44): 43489-43495.
- Taurog, A. (2000). "Hormone synthesis." Braverman LE, Utiger R, editors. *The Thyroid*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins: 61-85.
- Tohyama, K., H. Kusuhara and Y. Sugiyama (2004). "Involvement of multispecific organic anion transporter, Oatp14 (Slc21a14), in the transport of thyroxine across the blood-brain barrier." *Endocrinology* 145(9): 4384-4391.

- Trajkovic-Arsic, M., J. Muller, V. M. Darras, C. Groba, S. Lee, D. Weih, K. Bauer, T. J. Visser and H. Heuer (2010a). "Impact of monocarboxylate transporter-8 deficiency on the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in mice." *Endocrinology* 151(10): 5053-5062.
- Trajkovic-Arsic, M., T. J. Visser, V. M. Darras, E. C. Friesema, B. Schlott, J. Mittag, K. Bauer and H. Heuer (2010b). "Consequences of monocarboxylate transporter 8 deficiency for renal transport and metabolism of thyroid hormones in mice." *Endocrinology* 151(2): 802-809.
- Trajkovic, M., T. J. Visser, J. Mittag, S. Horn, J. Lukas, V. M. Darras, G. Raivich, K. Bauer and H. Heuer (2007). "Abnormal thyroid hormone metabolism in mice lacking the monocarboxylate transporter 8." *J Clin Invest* 117(3): 627-635.
- Tu, H. M., G. Legradi, T. Bartha, D. Salvatore, R. M. Lechan and P. R. Larsen (1999). "Regional expression of the type 3 iodothyronine deiodinase messenger ribonucleic acid in the rat central nervous system and its regulation by thyroid hormone." *Endocrinology* 140(2): 784-790.
- Umesono K, M. K., Thompson CC, Evans RM. (1991). "Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors." *Cell Jun* 28;65(7): 1255-1266.
- Verge, C. F., D. Konrad, M. Cohen, C. Di Cosmo, A. M. Dumitrescu, T. Marcinkowski, S. Hameed, J. Hamilton, R. E. Weiss and S. Refetoff (2012). "Diiodothyropropionic acid (DITPA) in the treatment of MCT8 deficiency." *J Clin Endocrinol Metab* 97(12): 4515-4523.
- Vermiglio, F., V. P. Lo Presti, M. Moleti, M. Sidoti, G. Tortorella, G. Scaffidi, M. G. Castagna, F. Mattina, M. A. Violi, A. Crisa, A. Artemisia and F. Trimarchi (2004). "Attention deficit and hyperactivity disorders in the offspring of mothers exposed to mild-moderate iodine deficiency: a possible novel iodine deficiency disorder in developed countries." *J Clin Endocrinol Metab* 89(12): 6054-6060.
- Verrey, F. (2003). "System L: heteromeric exchangers of large, neutral amino acids involved in directional transport." *Pflugers Arch* 445(5): 529-533.
- Visser, W. E., E. C. Friesema, J. Jansen and T. J. Visser (2008). "Thyroid hormone transport in and out of cells." *Trends Endocrinol Metab* 19(2): 50-56.
- Visser, W. E., J. Jansen, E. C. Friesema, M. H. Kester, E. Mancilla, J. Lundgren, M. S. van der Knaap, R. J. Lunsing, O. F. Brouwer and T. J. Visser (2009). "Novel pathogenic mechanism suggested by ex vivo analysis of MCT8 (SLC16A2) mutations." *Hum Mutat* 30(1): 29-38.
- Wagner, R. L., J. W. Apriletti, M. E. McGrath, B. L. West, J. D. Baxter and R. J. Fletterick (1995). "A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor." *Nature* 378(6558): 690-697.
- Wang, D., X. Xia, Y. Liu, A. Oetting, R. L. Walker, Y. Zhu, P. Meltzer, P. A. Cole, Y. B. Shi and P. M. Yen (2009). "Negative regulation of TSHalpha target gene by thyroid hormone involves histone acetylation and corepressor complex dissociation." *Mol Endocrinol* 23(5): 600-609.
- Weeke, J. and H. Orskov (1973). "Synthesis of 125I monolabelled 3, 5, 3'-triiodothyronine and thyroxine of maximum specific activity for radioimmunoassay." *Scand J Clin Lab Invest* 32(4): 357-360.
- Weeke, J. and H. Orskov (1975). "Ultrasensitive radioimmunoassay for direct determination of free triiodothyronine concentration in serum." *Scand J Clin Lab Invest* 35(3): 237-244.
- Williams, G. R. (2008). "Neurodevelopmental and neurophysiological actions of thyroid hormone." *J Neuroendocrinol* 20(6): 784-794.
- Williams GR, Z. A., Harney JW, Brent GA. (1994). "Thyroid hormone receptor binds with unique properties to response elements that contain hexamer domains in an inverted palindrome arrangement." *Endocrinology*. Apr;134(4): 1888-1896.

- Wirth, E. K., S. Roth, C. Blechschmidt, S. M. Holter, L. Becker, I. Racz, A. Zimmer, T. Klopstock, V. Gailus-Durner, H. Fuchs, W. Wurst, T. Naumann, A. Brauer, M. H. de Angelis, J. Kohrle, A. Gruters and U. Schweizer (2009). "Neuronal 3',3,5-triiodothyronine (T3) uptake and behavioral phenotype of mice deficient in Mct8, the neuronal T3 transporter mutated in Allan-Herndon-Dudley syndrome." *J Neurosci* 29(30): 9439-9449.
- Yen, P. M. (2001). "Physiological and molecular basis of thyroid hormone action." *Physiol Rev* 81(3): 1097-1142.
- Yen, P. M., X. Feng, F. Flamant, Y. Chen, R. L. Walker, R. E. Weiss, O. Chassande, J. Samarut, S. Refetoff and P. S. Meltzer (2003). "Effects of ligand and thyroid hormone receptor isoforms on hepatic gene expression profiles of thyroid hormone receptor knockout mice." *EMBO Rep* 4(6): 581-587.
- Zoeller, R. T. and J. Rovet (2004). "Timing of thyroid hormone action in the developing brain: clinical observations and experimental findings." *J Neuroendocrinol* 16(10): 809-818.

## Apendice: Publicaciones relacionadas

---



## Transient Cerebral cortex hyperthyroidism in newborn *Mct8*-deficient mice, abolished by *Lat2* inactivation

Bárbara Núñez, Virginia Nunes, Manuel Palacín, M. J. Obregón, Beatriz Morte, Juan Bernal

Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” de Madrid, CSIC-UAM, Madrid; Institut de Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL)-UB, Barcelona, and Center for Biomedical Research on Rare Diseases Units 708, 730, and 731, Spain.

### ABSTRACT

Thyroid hormone (T4 and T3) entry into cells is facilitated by transmembrane protein transporters. Mutations of the specific T4 and T3 transporter, MCT8 (Monocarboxylate Transporter 8, SLC16A2) cause an X-linked syndrome of profound neurological impairment and altered metabolism of thyroid hormones. MCT8 deficiency presumably results in failure of thyroid hormone to reach the neural target cells in adequate amounts to sustain normal brain development. The contribution of other transporters to thyroid hormone metabolism and action, especially in the context of MCT8 deficiency is not clear. We have analyzed the role of the heterodimeric aminoacid transporter *Lat2* (*Slc7a8*) in mice on the expression of thyroid hormone-dependent cerebral cortex genes, in the presence and absence of a functional *Mct8*. To this end we generated *Lat2*<sup>-/-</sup>, and *Mct8*<sup>-/-</sup>*Lat2*<sup>-/-</sup> mice, to compare with wild type (WT) and *Mct8*<sup>-/-</sup> mice. The *Lat2*<sup>-/-</sup> mice show slightly reduced circulating concentrations of T4 and T3, but normal expression of liver *Dio1*. Gene expression patterns in *Mct8*<sup>-/-</sup>*Lat2*<sup>-/-</sup> were in general similar to *Mct8*<sup>-/-</sup>. However, newborn *Mct8*<sup>-/-</sup> mice showed a paradoxical enhancement of gene expression in the cerebral cortex, which was prevented by *Lat2* deficiency. The results suggest that an early role of *Mct8* could be the clearance of thyroid hormone from the brain by facilitating degradation or efflux. They also indicate that *Lat2* has a role in the supply of T3 to neurons during early postnatal development.

Manuscrito en preparación

Corresponding author:  
Juan Bernal. E-mail: jbernal@iib.uam.es





## **Increased oxidative metabolism and neurotransmitter cycling in the brain of mice lacking the thyroid hormone transporter Slc16a2 (*Mct8*).**

Tiago B. Rodrigues, Ainhoa Ceballos, Carmen Grijota-Martínez, Barbara Nuñez, Samuel Refetoff, Sebastian Cerdán, Beatriz Morte and Juan Bernal

Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” de Madrid, CSIC-UAM, Spain; Cancer Research UK Cambridge Institute and Department of Biochemistry, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom; Center for Biomedical Research on Rare Diseases, Madrid, Spain and Departments of Medicine, Pediatrics and Genetics, University of Chicago, Chicago, Illinois 60637.

### **ABSTRACT**

Mutations of the monocarboxylate transporter 8 (MCT8) cause a severe X-linked intellectual deficit and neurological impairment. MCT8 is a specific thyroid hormone ( $T_4$  and  $T_3$ ) transporter and the patients also present an unusual profile of thyroid hormone concentrations in serum due to altered secretion and metabolism of  $T_4$  and  $T_3$ . Given the role of thyroid hormones in brain development, it is thought that the neurological impairment is due to restricted transport of thyroid hormones to the target neurons. In this work we have investigated cerebral metabolism using  $^{13}\text{C}$  Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy in mutant mice with *Mct8* deficiency. Adult male mice were infused for 30 minutes with (1- $^{13}\text{C}$ ) glucose and brain extracts prepared and analyzed by  $^{13}\text{C}$  Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Genetic inactivation of *Mct8* resulted in increased oxidative metabolism as reflected by increased glutamate C4 enrichment, and of glutamatergic and GABAergic neurotransmissions as observed by the increases in glutamine C4 and GABA C2 enrichments, respectively. These changes were distinct to those produced by hypothyroidism or hyperthyroidism. Similar increments in glutamate C4 enrichment and GABAergic neurotransmission were observed in the combined inactivation of *Mct8* and *Dio2*, indicating that the increased neurotransmission and metabolic activity were not due to increased production of cerebral  $T_3$  by the *Dio2*-encoded type 2 deiodinase. In conclusion, *Mct8* deficiency has important metabolic consequences in the brain that could not be correlated with deficiency or excess thyroid hormone supply to the brain.

Manuscrito en preparación

Corresponding authors:

Juan Bernal: jbernal@iib.uam.es

Beatriz Morte: bmorte@iib.uam.es